

Estudio cromosómico en tres especies de *Karwinskia* (Rhamnaceae) endémicas de México

FERNANDO TAPIA-PASTRANA^{*}
RAFAEL FERNÁNDEZ NAVA^{**}
SANDRA GÓMEZ-ACEVEDO^{***}
PEDRO MERCADO-RUARO^{***}

Resumen. Se analizaron citogenéticamente células de meristemas radiculares obtenidos de semillas provenientes de 5-10 individuos de cada una de las siguientes especies: *Karwinskia mollis* (Guadalcázar, San Luis Potosí), *K. tehuacana* (Atoyatempan, Puebla) y *K. umbellata* (Ahuetzingo, Morelos). El número cromosómico $2n=24$ fue constante para las tres especies, con $x=12$ como número básico; se obtuvieron además, la longitud cromosómica total diploide y el intervalo cromosómico. Los complementos cromosómicos se caracterizaron por cromosomas muy pequeños (0.68-1.28 μm), predominando aquellos con centrómero medio y submedio. El par cromosómico más pequeño de cada especie presentó una constricción secundaria, relativamente amplia, asociada a una notoria porción satelital. Los datos se compararon con los obtenidos en un estudio citogenético previo realizado en *K. humboldtiana*. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que muy probablemente los cambios cromosómicos han tenido una escasa participación en los eventos de especiación del género *Karwinskia*; sin embargo, las diferencias en las tallas de los complementos cromosómicos se consideran como una posible explicación de la distribución actual de estas especies.

Palabras clave: *Karwinskia*, México, citogenética, especies endémicas, números cromosómicos, talla cromosómica, especiación.

^{*} Laboratorio de Genecología, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM. Apartado postal 9-020, 15000 México, D.F. pasfer@correo.unam.mx

^{**} Laboratorio de Botánica Fanerogámica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Apartado postal 17-564, 11410 México, D.F.

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

Abstract. Meristematic root cells from germinating seeds of 5-10 individuals of each of the following species: *Karwinskia mollis* (Guadalajara, San Luis Potosí), *K. tehuacana* (Atoyatempan, Puebla) and *K. umbellata* (Ahuetzingo, Morelos) were cytogenetically analyzed. The chromosome number of $2n=24$ was constant in the three species with a basic number of $x=12$; total diploid chromosome length and chromosome interval were also obtained. The chromosome complements were characterized by very small chromosomes (0.68-1.28 μm), predominating those with median and submedian centromeres. The smallest chromosome pair of each species presented a secondary constriction, associated to a marked satellite portion. The comparison of these data with those previously reported for *K. humboldtiana* suggests that chromosomal changes probably have had a scarce influence in speciation events of *Karwinskia*; however, the differences in size of the chromosome complements are considered as a possible explanation for the present distribution of these species.

Key words: *Karwinskia*, México, cytogenetics, endemic species, chromosome numbers, chromosome size, speciation.

Introducción

El género *Karwinskia* Zucc. (Rhamnaceae) incluye árboles y arbustos asociados frecuentemente a las zonas áridas, bosques tropicales caducifolios, pastizales y zonas ecotonales de encinares y matorrales xerófilos. La literatura registra 19 especies que se distribuyen desde el S de los Estados Unidos de América hasta el N de Colombia y las Antillas. En México, centro de distribución del género, vegetan 11 especies de las cuales 9 son endémicas, todas ellas reconocidas como plantas tóxicas causantes de envenenamiento en ganado y en niños de poblaciones rurales. *Karwinskia humboldtiana* (Roem. et Schult.) Zucc., alcanza la mayor distribución y tolerancia ecológica (0-2200 msnm), mientras que *Karwinskia mollis* Schlecht., *Karwinskia tehuacana* Fernández et Waksman y *Karwinskia umbellata* (Cav.) Schlecht., representan especies con distribución más restringida, endémicas de algunos estados del centro del país, asociadas principalmente a bosques tropicales caducifolios y matorrales xerófilos (Fernández, 1992; Fernández et Waksman, 1992).

Aunque el examen cromosómico se ha reconocido como una herramienta útil en el esclarecimiento de afinidades específicas, centros de origen, patrones evolutivos y de distribución de las especies vegetales (Grant, 1987; Kenton *et al.*, 1986; Poggio *et al.*, 1989; Tapia-Pastrana *et al.*, 1999), las plantas de este género han recibido escasa atención desde el punto de vista citogenético y hasta la fecha la literatura registra sólo un estudio detallado (Tapia-Pastrana *et al.*, 2002).

Este trabajo incluye el análisis citogenético en células somáticas de individuos de *Karwinskia mollis*, *K. tehuacana* y *K. umbellata*, muestra la constancia en el número cromosómico de las mismas y discute sobre el papel de la remodelación cromosómica en los procesos de especiación del género. Se intenta explicar así-

mismo, el patrón de distribución ecogeográfica actual de estas plantas como una función de la talla cromosómica, carácter con significado funcional y adaptativo.

Materiales y métodos

De septiembre a diciembre del 2000 se colectaron semillas de 5-10 individuos de hábito arbustivo de cada una de las siguientes especies: *Karwinskia mollis* (Guadalcázar, San Luis Potosí) *K. tehuacana* (Atoyatempan, Puebla) y *K. umbellata* (Ahuetzingo, Morelos) (Fig. 1). Se seleccionaron individuos separados entre sí por no menos de 30 metros sobre un transecto mayor a 200 metros. Los ejemplares de respaldo fueron depositados en el Herbario FEZA. Lotes de 30-40 semillas fueron germinados en cajas de Petri sobre algodón humedecido con agua destilada a temperatura ambiente y en luz natural. Por lo menos 30 meristemos apicales fueron separados de raíces de 1-2 cm de longitud, pretratados en 8-hidroxiquinoleína 0.002 M durante 5 horas a temperatura ambiente y fijados en solución Farmer (etanol: ácido acético, 3:1).

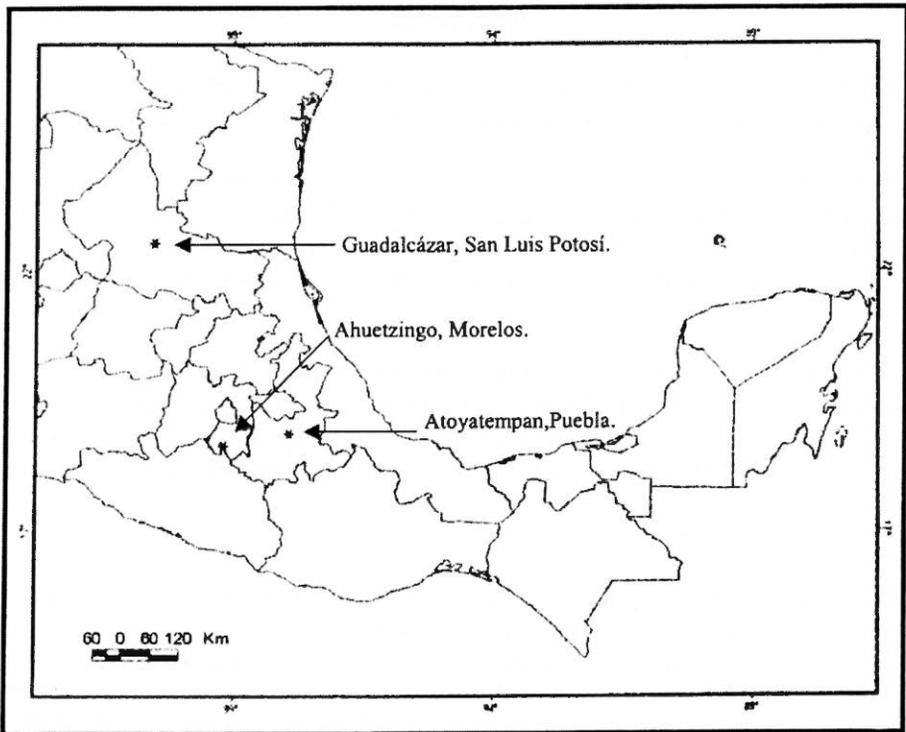


Fig. 1. Mapa de ubicación de las poblaciones estudiadas.

Para la obtención de los cromosomas en metafase se siguió un método de secado al aire que permite evaluar con mayor precisión el tamaño cromosómico (Tapia-Pastrana y Mercado-Ruaro, 2001) y que se describe brevemente a continuación: los meristemos pretratados fueron macerados en una mezcla de pectinasa 20% y celulasa 2% durante 2 horas a 37 °C. El botón celular fue separado por centrifugación (1500 rpm) durante 10 minutos y transferido a solución de KCl 0.075 M durante 20 minutos a 37 °C; luego de lavados sucesivos con solución fresca se procedió a fijar en Farmer lavando posteriormente dos veces más; dos gotas del botón celular se dejaron caer y secar al aire sobre laminillas previamente desengrasadas; la tinción se realizó con Giemsa 10%. Las preparaciones se hicieron permanentes con resina sintética.

Los mejores campos fueron fotografiados en un microscopio óptico Carl Zeiss Axioskop usando película Kodak Technical Pan. La identificación morfológica de los cromosomas se realizó utilizando las cinco mejores placas metafásicas (con la misma amplificación) de cada especie y las magnitudes cromosómicas se obtuvieron utilizando un vernier digital (Mitutoyo Digimatic Caliber CD-G´´BS).

Resultados

K. mollis. En esta especie se revisaron 316 células en metafase. Con excepción de una célula tetraploide las restantes exhibieron un número $2n=24$. La longitud cromosómica total diploide (LCTD) fue de $23.52 \pm 3.21 \mu\text{m}$ y el intervalo cromosómico de $0.68 \pm 0.05 \mu\text{m}$ a $1.28 \pm 0.22 \mu\text{m}$ (Cuadro 1). En las imágenes predominaron cromosomas que correspondían a metacéntricos y submetacéntricos pequeños (complemento medianamente simétrico). El par más pequeño de este último grupo exhibió de manera constante una constricción secundaria y una porción satelital (Fig. 2 a).

K. tehuacana. Se analizaron 155 células metafásicas con un número $2n = 24$. No se hallaron células tetraploides. En los complementos, la LCTD fue de $22.85 \pm 4.53 \mu\text{m}$ incluyendo cromosomas muy pequeños con centrómeros medios y submedios cuya talla varió de $0.75 \pm 0.15 \mu\text{m}$ hasta $1.22 \pm 0.24 \mu\text{m}$ (Cuadro 1). Una larga constricción secundaria y porción satelital se observó de manera constante en el par más pequeño (Fig. 2b).

K. umbellata. Se revisaron 42 células en metafase típica, 41 de éstas mostraron un número $2n = 24$ y sólo una exhibió $2n=48$. La LCTD fue de $22.42 \pm 3.39 \mu\text{m}$. El intervalo de la talla cromosómica fue de $0.73 \pm 0.13 \mu\text{m}$ hasta $1.24 \pm 0.19 \mu\text{m}$ (Cuadro 1). En las imágenes predominaron cromosomas que correspondían a metacéntricos y submetacéntricos muy pequeños similares a los obtenidos en las otras dos especies (Fig. 2c). Como en los casos anteriores, particularmente evidente en metafases tempranas correspondió al par más pequeño portar una constricción

Cuadro 1. Magnitudes cromosómicas de las especies estudiadas

| Especie | 2n | LCTD (μm) | IC (μm) |
|-----------------------------|----|------------------------|---------------------------------|
| <i>Karwinskia mollis</i> | 24 | 23.52 ± 3.21 | $0.68 \pm 0.05 - 1.28 \pm 0.22$ |
| <i>Karwinskia tehuacana</i> | 24 | 22.85 ± 4.53 | $0.75 \pm 0.15 - 1.22 \pm 0.24$ |
| <i>Karwinskia umbellata</i> | 24 | 22.42 ± 3.39 | $0.73 \pm 0.13 - 1.24 \pm 0.19$ |

LCTD = Longitud Cromosómica Total Diploide expresada en μm .

IC = Intervalo Cromosómico expresado en μm .

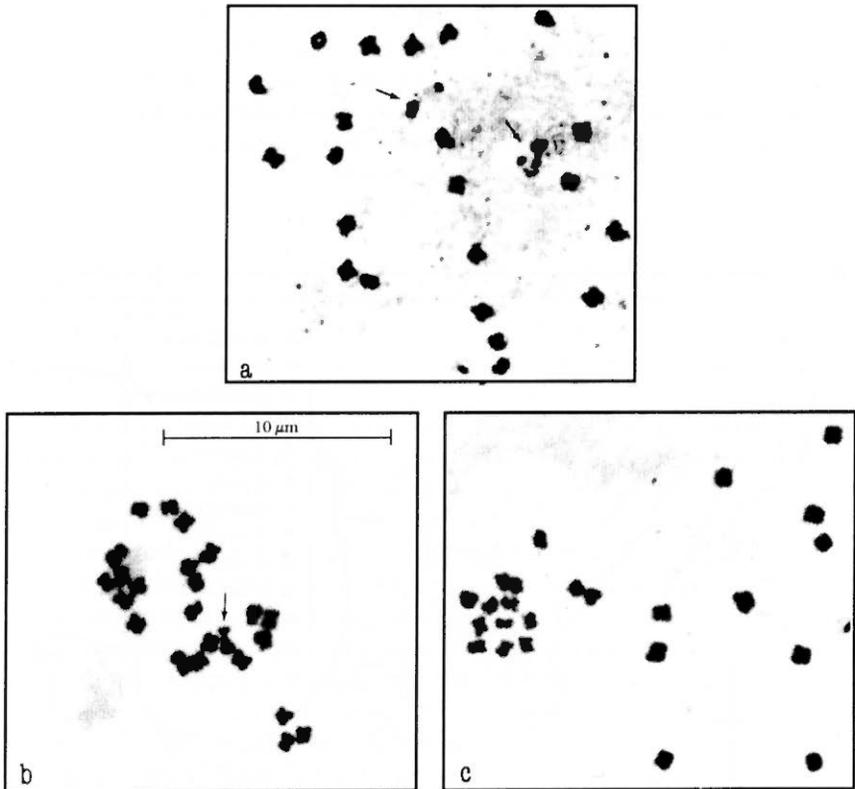


Fig. 2. Núcleos en metafase obtenidos mediante extendido y secado al aire. a) *Karwinskia mollis* $2n = 24$, b) *Karwinskia tehuacana* $2n = 24$, c) *Karwinskia umbellata* $2n = 24$. Las flechas señalan los cromosomas que portan satélite. Barra = $10 \mu\text{m}$.

ción secundaria y porción satelital. Los anteriores son los primeros registros citogenéticos para las especies bajo estudio.

Discusión y conclusiones

Actualmente se reconoce a nuestro país como el centro de distribución y posible centro de origen del género *Karwinskia* (Rzedowski, 1998). La distribución actual del grupo (Fig. 3) muestra especies con una ecogeografía limitada y una especie, *K. humboldtiana*, con poblaciones que prosperan en diferentes condiciones y zonas geográficas, particularmente en las zonas áridas y semiáridas del norte y centro de México, así como en el bosque tropical perennifolio, bosque tropical caducifolio, bosque de encino y pastizal, lo que la exhibe como el taxón de mayor tolerancia ecológica del género (Fernández, 1992). En este sentido, *Karwinskia* representa un grupo de interés desde el punto de vista fitogeográfico y evolutivo.

A pesar de lo anterior, el grupo no ha sido estudiado citogenéticamente en la búsqueda de correlaciones entre condiciones ecológico/ambientales y algún tipo de variación genética o citogenética que examine su papel en la distribución y

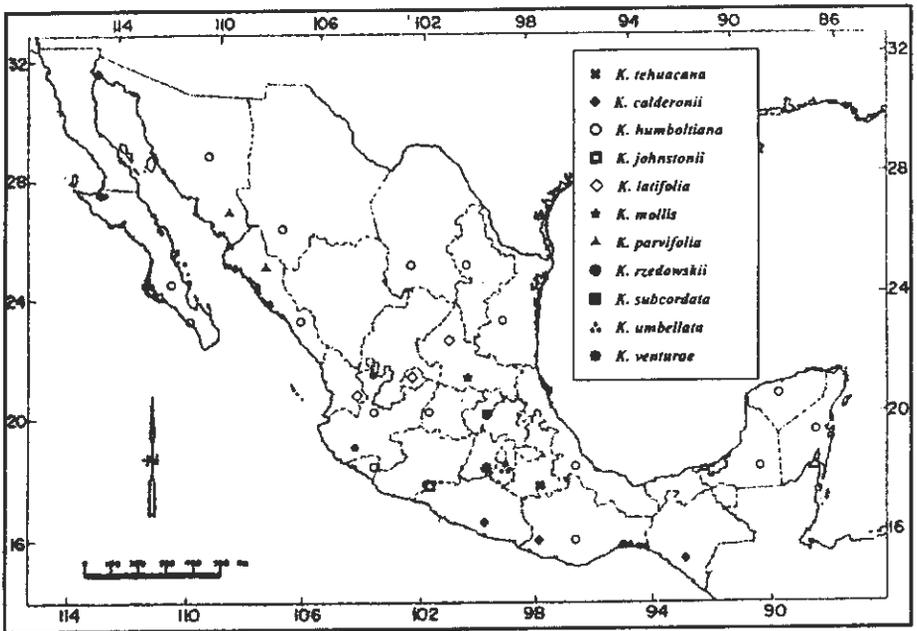


Fig. 3. Distribución geográfica de las especies del género *Karwinskia* en México (modificado de Fernández, 1992).

evolución del género. Al momento sólo se registra en la literatura un estudio cariológico detallado de una población de *Karwinskia humboldtiana* del Valle de Actopan, Hidalgo, México (Tapia-Pastrana *et al.*, 2002) y se trabaja actualmente en la elaboración de un esquema general sobre la filogenia del grupo (Fernández, en preparación).

En este sentido, el estudio de los sistemas genéticos no sólo juega un papel importante en la interpretación y elucidación de las relaciones entre géneros y especies de plantas, así como de sus centros de origen; además, ofrece una interpretación más precisa de la interacción genotipo-ambiente, su probable efecto sobre la remodelación cromosómica y su asociación a determinadas áreas o hábitats (Price *et al.*, 1973, 1986; Bennett y Smith, 1976; Kenton y Heywood, 1984; Tapia-Pastrana *et al.*, 1999).

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta investigación son consistentes, en lo general, con aquellos registrados para *Karwinskia humboldtiana*. En efecto, las poblaciones de *K. mollis*, *K. tehuacana* y *K. umbellata* aquí estudiadas mostraron una constancia en el número cromosómico diploide $2n = 24$, baja frecuencia de polisomatía y complementos caracterizados por cromosomas de talla reducida, donde invariablemente el par más pequeño exhibió una constricción secundaria asociada a una conspicua porción satelital. Los cariotipos correspondientes, como el detallado para *K. humboldtiana*, $8m + 4sm$ (Tapia-Pastrana *et al.*, 2002), no se realizaron debido a que en algunos cromosomas no se logró ubicar con la exactitud necesaria la posición del centrómero. No obstante, las imágenes obtenidas apuntan hacia la presencia de complementos medianamente simétricos (debido a la predominancia de cromosomas con centrómeros medios y submedios) muy similares a los de *K. humboldtiana*.

La constancia en el número diploide y la similitud en las características cromosómicas de las especies aquí estudiadas indicarían una escasa participación, si la hay, de procesos de remodelación cromosómica en los eventos de especiación del grupo, en favor de una especiación por cambios génicos, situación que deberá confirmarse estudiando al resto de las especies. Nuestros datos también confirman al número cromosómico diploide $2n = 24$, como uno de los más constantes en la familia Rhamnaceae, encontrándose también en los géneros *Berchemia*, *Ziziphus*, *Rhamnus*, *Condalia*, *Ceanothus*, *Hovenia* y *Pomaderris* entre otros (Moore, 1973; Goldblatt, 1981; Harvey y Rattenbury, 1985; Goldblatt y Johnson, 1990). Estos datos también señalan a $x=12$ como número básico del género *Karwinskia*.

En relación con la talla cromosómica, los resultados muestran una mínima variación entre la LCTD de las tres especies bajo estudio (véase Cuadro 1), característica que difiere considerablemente respecto a la LCTD registrada para *Karwinskia humboldtiana* ($28.72 \mu\text{m}$ e intervalo cromosómico $0.88 \mu\text{m} - 1.49 \mu\text{m}$ [Tapia *et al.*, 2002]) pues, en promedio, la diferencia supera los cinco micrómetros, lo que, por una parte explica que aquella especie cuente con una propuesta de cariotipo y, por otra, señalaría la existencia de variación interespecífica en la LCTD

del género *Karwinskia*, rasgo que podría representar un carácter adaptativo. Los datos obtenidos sugieren además, una diferenciación de genotipos y posibles implicaciones ecológicas en los patrones de distribución geográfica de las especies examinadas. Fenómenos similares han sido observados en especies pertenecientes a diversos géneros (Bennet, 1972; Kenton *et al.*, 1986; Price, H. J., 1988; Salimuddin y Ramesh, 1994; Tapia *et al.*, 1999; Gómez-Acevedo y Tapia-Pastrana, 2003).

En efecto, las diferencias observadas entre las especies de *Karwinskia* hasta ahora estudiadas citogenéticamente podrían reflejar un incremento en la variabilidad interespecífica asociada con una especialización del genoma y adaptación a diversos ambientes (Cullis, 1990). Así, la amplia distribución ecogeográfica de *K. humboldtiana* se explicaría en función de una capacidad de respuesta mayor, de origen genético u ontogénico, que contribuye a que sus poblaciones se enfrenten y sobrevivan a diferentes factores climáticos, geográficos y de hábitat. En contraparte, especies como *K. mollis*, *K. tehuacana* y *K. umbellata*, tendrían menor repertorio de respuesta y por lo tanto, una distribución más restringida debido a una menor talla de sus complementos.

Lo anterior adquiere mayor sentido si se considera que *Karwinskia humboldtiana* es la especie del género que presenta no sólo mayor área de distribución y tolerancia ecológica, sino la que muestra poblaciones más numerosas. Asimismo, es la que ofrece mayor dificultad para delimitar taxonómicamente, ya que presenta polimorfismo en hojas, flores y frutos, existiendo poblaciones en Baja California Sur y en la Península de Yucatán cuyos individuos presentan variantes en cuanto a tamaño y forma de las hojas. Un aspecto interesante de su fenología es la amplitud en sus periodos, tanto de floración (junio-septiembre) como de fructificación (agosto-enero) (Fernández, 1992).

Por su parte, *Karwinskia tehuacana* y *K. umbellata*, con períodos de floración y fructificación más breves y áreas de distribución y cotas altitudinales estrechas (Fernández, 1992; Fernández y Waksman, 1992), exhibieron las tallas más pequeñas en sus complementos cromosómicos. Finalmente, *K. mollis*, que en este estudio tuvo una LCTD mayor a la exhibida por las dos anteriores, tiene una cota altitudinal de distribución (1000-2000 msnm) y tolerancia ecológica más amplias, siendo la segunda especie con mayor distribución geográfica en el género, detrás de *K. humboldtiana* (Fernández, 1992).

Aunque es posible especular acerca de la respuesta de los genomas a ambientes especiales, otros resultados ya han mostrado una alta y positiva correlación entre la longitud total del complemento cromosómico y el contenido de ADN en plantas (Smith y Bennett, 1975; Price, 1976; Kenton *et al.*, 1986; Cavallini y Natali, 1991; Poggio *et al.*, 1992) y grupos cuyos complementos cromosómicos confirman que la divergencia y especiación se acompañan por cambios cuantitativos masivos en el material genético, independientemente del número cromosómico, como resultado de amplificaciones y deleciones de secuencias de base dentro de los cromosomas y que tales cambios, teniendo un carácter adaptativo, generan patrones bien defi-

nidos de evolución entre los complementos cromosómicos de los diferentes géneros (Rees y Narayan, 1989). Las consecuencias de tales variaciones pueden manifestarse desde el nivel celular y multicelular, involucrando caracteres funcionales que influyen probablemente en las propiedades ecológicas y en los patrones geográficos de las especies (Bennett y Smith, 1976; Price, 1988; Poggio *et al.*, 1989).

Agradecimientos. Los autores agradecemos al M. en C. Francisco González Medrano y al Dr. Alfonso Delgado Salinas por la revisión crítica del manuscrito.

Literatura citada

- BENNETT, M.D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 181: 109 - 135.
- BENNETT, M.D. y J.B. SMITH. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 274: 227 - 274.
- CAVALLINI, A. y L. NATALI. 1991. Intraspecific variation of nuclear DNA content in plant species. *Caryologia* 44: 93-107.
- CULLIS, C.A. 1990. DNA rearrangements in response to environmental stress. *Advances in Genetics* 28: 73 - 97.
- 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: 1-23.
- 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-ACEVEDO, S.L. y F. TAPIA-PASTRANA. 2003. Estudio genecológico en *Prosopis laevigata*, *Acacia farnesiana* y *Acacia schaffneri* (Leguminosae). *Darwiniana* 41: 47-54.
- GRANT, F. 1987. Genome differentiation in higher plants, In: K. M. Urbanska (ed). *Differentiation patterns in higher plants*. Academic, London, pp. 9-32.
- HARVEY, C.F. y J.A. RAITENBURY. 1985. Microsporogenesis and pollen viability in New Zealand taxa of *Pomaderris* Labill. (Rhamnaceae). *New Zealand Journal of Botany* 23: 321-330.
- KENTON, A.Y. y C. A. HEYWOOD. 1984. Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Systematics and Evolution* 144: 221 - 240.
- 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.
- MOORE, R.J. 1973. Index to plant chromosome number 1907-1971. International Bureau for Plant Taxonomy and Nomenclature, Utrecht. p. 267.
- POGGIO, L., A.D. BURGHARDT y J.H. HUNZIKER. 1989. Nuclear DNA variation in diploid and polyploid taxa of *Larrea* (Zygophyllaceae). *Heredity* 63: 321-328.

- POGGIO, L., J.H. HUNZIKER Y A.F. WULFF. 1992. Cariotipo y contenido de ADN nuclear de *Pintoa chilensis* y *Sisymbrium sparteum* (Zygophyllaceae). *Darwiniana* 31: 11-15.
- PRICE, H.J., A.H. SPARROW Y A.F. NAUMAN. 1973. Correlations between nuclear volume, cell volume, and DNA content in meristematic cell of herbaceous angiosperms. *Experientia* 29: 1028 - 1029.
- PRICE, H.J. 1976. Evolution of DNA content in higher plants. *Botanical Review* 42: 27-52.
- PRICE, H.J., J.L. CHAMBERS, K. BACHMANN Y J. RIGGS. 1986. Pattern of mean nuclear DNA content in *Microseris douglasii* (Asteraceae) populations. *Botanical Gazette* (Crawfordsville) 147: 496 - 507.
- PRICE, H.J. 1988. DNA content variation among higher plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1248-1257.
- REES, H. Y R.K.J. NARAYAN. 1989. Biological implications of genome evolution. In: C.H. Stirton & J.L. Zarucchi (eds.) *Advances in Legume Biology. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 29: 533-544.
- RZEDOWSKI, J. 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. In: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (comps.). *Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 129-145.
- SALIMUDDIN Y B. RAMESH. 1994. Karyotype, nuclear and chromosomal DNA variation in *Lens culinaris* Med. *Cytologia* 59: 7-15.
- SMITH, J.B. Y M.D. BENNETT. 1975. DNA variation in *Ranunculus*. *Heredity* 35: 231-239.
- 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: 11-17.
- TAPIA-PASTRANA, F., P. MERCADO-RUARO, A. LÓPEZ S. Y S. GÓMEZ A. 2002. Estudio citogenético en *Karwinskia humboldtiana* (Rhamnaceae) del valle de Actopan, Hidalgo, México. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 73 (1): 17-25.

Recibido: 12.vi.2003

Aceptado: 4.v.2004