

32
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

" BIOLOGIA "

ANALISIS DE LA DINAMICA NUCLEOLAR Y
REGIONES CROMOSOMICAS ASOCIADAS DURANTE
LA PROFASE MEIOTICA DE *Prosopis laevigata*
(MEZQUITE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE LUIS ZAVALA PALOMARES

U N A M
P E S
Z A R A G O Z A



LA UNAM
EN MEXICO

DIRECTOR DE TESIS:

BIOL. LUIS FERNANDO TAPIA PASTRANA

LABORATORIO DE GENECOLOGIA

MEXICO, D. F.

1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre.

A mi padre, por su apoyo y preocupación en alcanzar mis aspiraciones y metas.

A mi esposa e hijas por su confianza, apoyo y compañía, así como compartir momentos importantes de mi vida.

A mis hermanos (as).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco grandemente a mi amigo y Director de Tesis, biólogo Luis Fernando Tapia Pastrana por la oportunidad recibida en la realización del presente trabajo.

Al M. en B. E. Enrique Mendieta Marquez, a los M. en C. Amadeo Barba Alvarez y Ma. Socorro Orozco Almanza, al M. en IBSH Alberto Monroy García, así como al biólogo Luis Fernando Tapia Pastrana, por su contribución en el mejoramiento de este trabajo.

A los biólogos Elvia Fabiola Morales Gómez y Genaro Ochoa de la Rosa por su tiempo y colaboración.

INDICE

1.-RESUMEN	1
2.-INTRODUCCION	3
3.-ANTECEDENTES	10
4.-PROBLEMATICA	12
5.-HIPOTESIS	14
6.-OBJETIVOS	15
6.1 Objetivo General	15
6.2-Objetivos Particulares	15
7. MATERIAL Y METODO	16
7.1 Aplastado y Tinción Aceto-carmin	16
7.2 Extendido de Microsporocitos e Impregnación Argéntica	17
8.- RESULTADOS	20
8.1-Técnica Estándar	20
8.2- Impregnación de Plata: estructuras reveladas por microscopía de luz	28
9.-ANALISIS DE RESULTADOS	34
9.1 Dinámica Vacuolar	34
9.2 Modelo de Impregnación y Banda NOR	40
10.-CONCLUSIONES	47

11.-LITERATURA CITADA	49
12.-ANEXO	
I.-GENERALIDADES DEL GENERO <i>Prosopis</i>	59
I.1-Distribución del Complejo <i>Prosopis</i>	59
I.2-Descripción Botánica	61
I.3-Datos Fenológicos	62
I.4-Importancia Económica	63
I.5-Usos del Mezquite	65
I.6-Importancia Ecológica	66
II.-DESCRIPCION DE LA ZONA DE MUESTREO	68
II.1-Ubicación	68
II.2-Composición de la Vegetación	68
II.3-Datos Climáticos	68

1.-RESUMEN

En la presente investigación se evaluaron, a nivel de microscopía óptica, los cambios morfológicos en la estructura nucleolar durante la profase meiótica, así como la localización de organizadores nucleolares en microsporocitos primarios de individuos de la leguminosa *Prosopis laevigata* (mezquite), provenientes del Valle del Mezquital. Diversos estudios previos donde se hace uso de las técnicas citogenéticas convencionales no suministran información suficiente en relación a los aspectos anteriores, por lo cual, es necesario el empleo de metodologías alternativas y complementarias como las impregnaciones argénticas, útiles para la observación de diversos caracteres citogenéticos en estudios de biología comparada.

El seguimiento del grado de compactación y comportamiento de los cromosomas meióticos permite establecer una correlación entre algunos subestadios de la profase meiótica y los cambios que experimenta el nucléolo cuando se analiza el número, dinámica y dimensiones de las llamadas vacuolas nucleolares, así como la localización de regiones cromosómicas asociadas a la estructura nucleolar y estrechamente relacionadas con su formación.

Así, fue posible apreciar que durante la profase temprana se forman pequeñas y numerosas vacuolas, y conforme progresa la meiosis, es decir al comienzo del paquíteno, se distingue una sola vacuola de gran dimensión, y en

los subestadios tardíos nuevamente se observan vacuolas pequeñas y numerosas, que posteriormente desaparecerán. Lo anterior representa el desarrollo de un ciclo vacuolar que experimenta el nucléolo durante toda la profase meiótica, fenómeno no descrito con anterioridad en estudios citogenéticos para el género *Prosopis*.

Alternativamente, el empleo de una técnica de impregnación argéntica para la profase meiótica permitió apreciar características de la topografía del nucléolo que quizás estén relacionadas con su actividad transcripcional, además de evidenciar a los cromosomas portadores de la banda o región NOR, que en *P. laevigata* fue identificada en la región telomérica de un sólo bivalente.

2.-INTRODUCCION

Los mezquites son, o fueron en algunas zonas, el estrato arbóreo o arbustivo dominante en muchas regiones áridas y semiáridas de México; sin embargo, a pesar del importante potencial económico del género *Prosopis*, aún no se han comprendido y explicado satisfactoriamente los patrones de distribución y la filogenia del grupo, esto es debido a la variabilidad morfológica, a su plasticidad fenológica y a la posible hibridación en zonas de simpatria, lo que ha dificultado los trabajos taxonómicos en algunas especies (Rzedowski, 1988; Galindo *et al.*, 1992).

A este respecto, numerosos autores han mostrado que los estudios citogenéticos son una herramienta útil en el esclarecimiento de afinidades genéricas y específicas, centros de origen, así como los patrones evolutivos en especies vegetales (Kenton *et al.*, 1986; Grant, 1987; Poggio *et al.*, 1989). Hoy día, para algunos citogenetistas, los estudios cariotípicos presentan mayor interés que los propios cromosomas individuales, pues el complemento cromosómico bien puede verse como un carácter especie-específico que ha evolucionado por medio de la selección natural y por lo tanto, involucraría un significado adaptativo para la población (Azkue y Jones, 1993; Kenton y Drakeford, 1989).

De esta manera, los estudios citogenéticos para el análisis del cariotipo involucran la apariencia fenotípica de los cromosomas que lo hacen único, como son: número básico, tamaño absoluto y relativo, posición del centrómero, distribución y tamaño de segmentos hetero y eucromáticos, así como el número y posición de satélites; esta estructura se encuentra separada del resto del cromosoma por una constricción secundaria (CS) que puede corresponder a la región del organizador nucleolar (Funaki *et al.*, 1975).

En este sentido, la búsqueda de marcadores genéticos y citogenéticos se presenta como un foco de atención relevante en estudios comparativos inter e intraespecíficos; así, la caracterización cada vez más detallada de la dinámica nuclear, la organización del ADN en los cromosomas y el comportamiento de otras estructuras nucleares asociadas, suministran nuevas evidencias o caracteres a considerar en los estudios filogenéticos, evolutivos y comparativos (Hamal, 1986; Langer y Koul, 1983).

En efecto, existen numerosos estudios en núcleos de células animales y vegetales que describen las características y topografía del nucléolo, su talla y forma, así como la dinámica de estructuras intranucleolares vistas como espacios claros (Chouinard, 1965; Johnson, 1969; De Barsey *et al.*, 1974; Love y Walsh, 1968; Moreno Díaz de la Espina *et al.*, 1980); sin embargo, dentro del género *Prosopis* no existen reportes que analicen la dinámica del nucléolo y los estudios citogenéticos se han limitado al análisis del cariotipo en células

somáticas y otros aspectos del comportamiento cromosómico en células germinales (Solbrig *et al.*, 1977; Hunziker *et al.*, 1986; Tapia *et al.*, 1995).

La ausencia de estudios que analicen el comportamiento del nucléolo y estructuras accesorias y la posible relación con los cambios conformacionales dramáticos que experimentan los cromosomas en profase meiótica en especies del género *Prosopis*, se explica en parte por la escasa atención que se ha prestado en el nivel citogenético de estas especies de uso potencial múltiple y bajo recomendación de mejora genética, y por otra, a la ausencia de metodologías adecuadas que permitieran la visualización, empleando microscopía óptica, de los sutiles cambios que experimenta la topografía nucleolar durante el progreso de la profase meiótica temprana. Tal panorama viene en parte a ser resuelto por la utilización de metodologías alternativas que facilitan un mapeo físico de estructuras anteriormente no consideradas en los estudios de citogenética básica, en particular en especies que presentan tallas cromosómicas tan pequeñas como las exhibidas por las especies del género *Prosopis* (0.6-1.23 μm) (Hunziker *et al.*, 1986; Tapia *et al.*, 1992).

En efecto, es necesario profundizar en el estudio de caracteres morfológicos y/o marcadores genéticos que ayuden a una más precisa caracterización en la identificación de poblaciones del género. Por ejemplo, un carácter citogenético de gran utilidad en el establecimiento de un mapeo físico cromosómico y de la estructura básica del cariotipo, son las regiones del organizador nucleolar (NOR, por sus siglas en inglés); por otro lado, el estudio

detallado de un organelo estrechamente relacionado con estas regiones, es el nucléolo, en cuyo interior se ha detectado la presencia de cuerpos claros referidos como vacuolas nucleolares (Jordan y Cullis, 1982). La caracterización del nucleolo en relación a los cambios que experimenta en su interior permite establecer algunas correlaciones con la conducta del complemento cromosómico meiótico incluyendo drásticos cambios en su morfología y bioquímica, con los cuales se intenta explicar la compleja dinámica del núcleo meiótico que aún dista de ser clara (Jordan, 1987; 1991).

Por otra parte, la identificación de los cromosomas que portan las regiones del organizador nucleolar (cromosomas nucleolares) es relevante pues éstos tienen un papel importante en el complemento cromosómico, ya que tales regiones se encuentran localizadas en regiones específicas de cromosomas específicos, lo que les confiere confiabilidad como caracteres a comparar pues su número, así como su ubicación, es variable de especie a especie y en ocasiones coincide con la constricción secundaria (Funaki *et al.*, 1975; Hamal, 1986). Sin embargo, la presencia de estas regiones no siempre se detecta fácilmente en cromosomas metafásicos; este impedimento se acentúa sobre todo, si los cromosomas son pequeños y el genoma de la especie en cuestión ha sido poco estudiado. Las regiones NOR han sido descritas sólo en pocas especies vegetales, algunos mamíferos, insectos, anfibios y en ciertos peces, a condición de que las tallas cromosómicas sean grandes, pues en complementos con tallas cromosómicas pequeñas los resultados han sido en general poco satisfactorios (Funaki *et al.*, 1975; Walter y Bertke, 1979).

En relación a su utilidad en estudios taxonómicos, la región organizadora nucleolar ha sido tomada como un carácter auxiliar para el estudio de genomas en poblaciones emparentadas (Kohlmann, 1993); por otra parte, en individuos de origen híbrido se ha notado que cambia de posición como resultado de la remodelación cromosómica, fenómeno bastante común en la especiación vegetal. También se ha observado en estos mismos individuos, fusiones de estas regiones, aumento de tamaño, su inhibición completa o parcial, así como la pérdida en uno de los cromosomas homólogos (Pelling y Beermann, 1965; Schubert, 1984; Cuñado *et al.*, 1985). Todo lo anterior justifica que el análisis y seguimiento del nucléolo y de las regiones NOR sean considerados como caracteres valiosos para el estudio inter e intraespecífico, en particular, en aquellas poblaciones que coexisten en zonas de simpatria (zonas híbridas) (Kohlmann, 1993). En otra perspectiva, el análisis de las regiones NOR es importante en la hipótesis de evolución del cariotipo en especies vegetales al proponer el número cromosómico básico, partiendo de la suposición de que las especies diploides poseen tan solo un par de cromosomas organizadores nucleolares, y de acuerdo al número de regiones nucleolares, se determina su poliploidía y se obtiene su número básico (Walter y Bertke, 1979).

La región organizadora nucleolar ha llamado la atención de citogenetistas y bioquímicos debido a su relación con el nucléolo (Hofgärtner *et al.*, 1979; Stahl *et al.*, 1991; Jordan, 1991). En efecto una región NOR está estrechamente vinculada a la nucleologénesis, es decir, con los eventos involucrados en el

origen y formación del nucléolo, así como aquellos cambios que experimenta en su interior (Ochs *et al.*, 1985). Tales fenómenos, así como su asociación con cromosomas específicos en los diferentes estadios del ciclo celular, pueden ser estudiados en células germinales, porque durante la profase meiótica los pares de cromosomas homólogos se elongan lo suficiente para ser bien caracterizados y sus particularidades morfológicas analizadas, incluso con microscopio óptico (Stahl *et al.*, 1991; Tapia *et al.*, 1995).

Cabe recordar que en la meiosis, un ciclo de replicación de ADN es seguido por dos ciclos de segregación cromosómica. Después de la replicación premeiótica de ADN, los cromosomas homólogos sufren el fenómeno de sinapsis y experimentan altos niveles de recombinación. En la primera división meiótica los cromosomas homólogos se mueven a polos opuestos; en la segunda división meiótica, las cromátidas hermanas se separan y segregan. Este es el mecanismo general por el cual se efectúa la transición de la fase diploide ($2n$) a la fase haploide (n) del ciclo de vida de los organismos que se reproducen sexualmente (Bhargava *et al.*, 1992; Loidl, 1991; Winking *et al.*, 1993). Así, la meiosis resulta en la producción de cuatro células hijas haploides a partir de una célula diploide. Lo anterior es esencial para la adecuada función de la meiosis, pues compensa así la duplicación cromosómica producto de la fertilización en organismos de reproducción sexual (Carpenter, 1988; Loidl, 1991).

La dinámica de la mayoría de los eventos propios de la meiosis es apreciable bajo el microscopio óptico: para las células vegetales se han desarrollado diversas metodologías y técnicas enfocadas particularmente a la visualización y análisis de las características morfológicas y el comportamiento de los cromosomas meióticos, que en general involucran el aplastado (squash) de microsporocitos primarios y su tinción con colorantes tales como el carmin y la oreceina (García, 1990). Sin embargo, la necesidad de particularizar ciertos aspectos citogenéticos inaccesibles con el empleo de técnicas convencionales o bien que no suministren evidencias suficientes, hace necesario proponer e implementar metodologías alternativas y/o complementarias como la impregnación argéntica, cuya especificidad radica en la afinidad de las sales de plata hacia algunos componentes del núcleo celular como son ciertas regiones del nucléolo y los NORs (Bloom y Goodpasture, 1976; Fletcher, 1979; Loidl y Grzilhuber, 1983; Dolezel *et al.*, 1989).

El uso de metodologías, como la utilizada en este trabajo, facilita la visualización a nivel de microscopía óptica del núcleo meiótico de una especie vegetal, suministrando valiosa información de su dinámica, incluido el comportamiento cromosómico, su organización y ubicación de las regiones NOR, caracteres citogenéticos considerados para el reconocimiento y entendimiento de especies y taxas superiores (Hamal, 1986).

3.-ANTECEDENTES

Las especies del género *Prosopis*, muestran una amplia variabilidad morfológica por lo que su tratamiento sistemático algunas veces es difícil e incierto (Hunziker *et al.*, 1986). Para la caracterización e identificación de las especies así como de algunos híbridos, muchas investigaciones en especies del género se han auxiliado de caracteres bioquímicos, morfológicos y citogenéticos, realizándose por ejemplo: estudios cromatográficos de compuestos fenólicos (Mooney *et al.*, 1977; Naranjo *et al.*, 1984), así como la comparación en la variación de esterasas (Saidman y Naranjo, 1982).

Asimismo, en los estudios morfológicos se han utilizado caracteres tales como sus frutos, considerando su curvatura y el enrollamiento (Burkart, 1976); otros autores como Palacios y Bravo (1975), reportan que algunas especies se pueden identificar utilizando caracteres de las semillas o bien, considerando la arquitectura foliar (Mooney *et al.*, 1977; Martínez, 1984). Para la subdivisión del género en secciones se ha utilizado la presencia o ausencia de espinas o acúleos, caracteres morfológicos que posiblemente tienen un significado filogenético (Burkart, 1976)

Por otra parte, los estudios citogenéticos realizados en especies del género se han enfocado principalmente al análisis del cariotipo en células somáticas de meristemos radiculares, así como el análisis del comportamiento cromosómico en células germinales, utilizando las técnicas de aplastado y tinción aceto-carmin (Naranjo *et al.*, 1984; Hunzinker *et al.*, 1986; Galindo *et al.*, 1992; Tapia *et al.*, 1993). Lo anterior explica la necesidad de analizar otros constituyentes nucleares tales como el nucléolo y estructuras asociadas en relación con el comportamiento cromosómico, ya que actualmente no existen reportes sobre la dinámica estructural en el interior del nucléolo, ni estudios previos sobre los cambios vacuolares (tanto en tamaño como en número). Por otro lado, tampoco se han realizado intentos para la localización de la región organizadora nucleolar (banda NOR) en el complemento cromosómico de las especies del género *Prosopis*.

Es claro entonces, la importancia de los estudios que con metodologías alternativas aborden estos aspectos citogenéticos, tanto desde el punto de vista del conocimiento básico sobre aspectos descriptivos de una serie de complejos procesos nucleares poco conocidos, así como el inicio de un mapeo físico del genoma de *P. laevigata*, por la perspectiva de su aplicación en la comprensión del fenómeno de hibridación que podría ser frecuente entre las especies del género *Prosopis*, pero cuya ocurrencia no se ha probado aún de modo satisfactorio (Galindo *et al.*, 1992), y cuyas consecuencias sobre la dinámica nuclear y nucleolar requieren especial atención.

4.-PROBLEMATICA

El manejo inadecuado de los recursos físicos y biológicos de las zonas áridas y semiáridas, ha ocasionado un grave deterioro en las condiciones generales de los mismos. Procesos tales como la deforestación, el avance de la desertización y el sobrepastoreo, se suman a la sobreexplotación de algunas especies vegetales; lo anterior se ha traducido no sólo en un decremento de la productividad y al empobrecimiento de las poblaciones humanas que allí habitan, sino también en la alteración de la estructura de las comunidades naturales vegetales e incluso la pérdida de algunas especies o bien, la acelerada disminución de alguna de ellas.

En México, como sabemos, una gran parte del territorio incluye zonas áridas y semiáridas que no escapan a los procesos arriba mencionados. Como ejemplo de lo anterior tenemos el caso de *Prosopis laevigata*, cuyas poblaciones han experimentado una pérdida considerable en sus áreas de distribución original, su carácter dominante, así como una drástica disminución de los individuos élite, es decir, de aquellos que presentan características arbóreas, mismas que son económicamente deseables. Debido a lo anterior, Hunziker *et al.* (1986), enfatizan la urgente necesidad de la conservación genética, de desarrollar programas de conservación y mejora genética.

No obstante, la puesta en marcha de tales programas requiere como punto de partida: investigaciones a nivel citogenético de la especie o especies de interés a fin de disponer de un conocimiento más integral, no siendo sólo de los procesos involucrados en la organización y estructuras de los cromosomas, sino de otras estructuras relevantes en los procesos de división celular mitótico y meiótico, y cuya dinámica esté estrechamente relacionada con el material hereditario. Bajo esta perspectiva la comprensión del sistema genético de cualquier especie involucrará necesariamente estudios detallados del complejo proceso meiótico, en particular, aquellos que contribuyan a una mejor comprensión del núcleo profásico.

Finalmente, en la actualidad muchos avances acerca de la estructura del material hereditario en especies vegetales ha sido el resultado de contar con metodologías novedosas que permitan una mejor comparación del funcionamiento y organización estructural del ADN (Heslop-Harrison, 1991). El número cromosómico, su talla y morfología, sus contenidos de ADN, los patrones de bandeado entre otros, se presentan comúnmente como excelentes caracteres de mapeo físico o citogenético.

Por otra parte, el mapeo físico de algunos genes a lo largo de los cromosomas en particular la de los genes ADN ribosomal (ADNr) en profase meiótica, su estrecha correlación con las regiones NOR y su expresión en la formación del nucléolo así como su dinámica en conjunto, se presenta como marcas finas a considerar en estudios filogenéticos y/o evolutivos.

5.-HIPOTESIS

Los análisis sobre la profase meiótica temprana han sido utilizados opcionalmente para el análisis citogenético de especies vegetales. En este sentido la implantación de una metodología alternativa de extendido y secado al aire para células meióticas y el empleo de la impregnación argéntica, complementado con las técnicas clásicas de aplastado y tinción carmín permitirá la visualización de la banda NOR y el seguimiento de la dinámica del nucléolo y los cambios que experimenta en relación al comportamiento cromosómico durante el progreso de la meiosis, permitiendo así un conocimiento más de la estructura cromosómica de una especie del género *Prosopis* (*P. laevigata*) y una visión integral de los eventos propios de la meiosis, mismos que son considerados caracteres citogenéticos valiosos en estudios taxonómicos y evolutivos.

6.-OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Conocer las características citogenéticas del núcleo profásico meiótico en microsporocitos de la leguminosa *Prosopis laevigata*.

6.2 Objetivos Particulares

I.-Estudiar aspectos de la dinámica nucleolar tales como la morfología y los cambios que sufren las vacuolas nucleolares mismos que se presentan durante el transcurso de la profase I de la meiosis.

II.-Analizar si tales variaciones están relacionadas con los cambios que experimentan los cromosomas en los distintos subestadios profásicos.

III.-Determinar el número y la localización de la región organizadora nucleolar en el complemento cromosómico de *Prosopis laevigata*.

IV.-Describir un modelo de actividad biosintética del nucléolo en *P. laevigata*.

7.-MATERIAL Y METODO

7.1 Aplastado y Tinción Aceto-carmin

En el análisis de núcleos en microsporocitos primarios de individuos de *P. laevigata*, se empleó una técnica convencional de aplastado (squash) y tinción aceto-carmin, donde se siguieron los pasos que a continuación se detallan: sobre un portaobjetos limpio, previamente desengrasado y bajo un estereoscopio (Zeiss) con objetivo 4X, se extrajeron con ayuda de una pinza y una aguja fina las anteras provenientes de una inflorescencia inmadura previamente fijada en solución Farmer (etanol-ácido acético, 3:1 v/v) y en la cual, se había verificado la presencia de células en profase.

Una vez separadas las anteras de los restos del botón floral, se añadió una gota de colorante aceto-carmin (1%); luego, y a fin de expulsar los microsporocitos contenidos en las anteras, éstas fueron golpeadas suavemente con la punta de una varilla de vidrio. Para lograr una mejor penetración del colorante, el portaobjetos se calentó brevemente sobre la flama de un mechero de alcohol y se adicionó una gota de aclarador Hoyers, con objeto de lograr un adecuado contraste de los cromosomas en el núcleo celular. Inmediatamente se colocó un cubreobjeto y sobre este un pedazo de papel filtro absorbente, y con la yema de los dedos se presionó suavemente para retirar el colorante en exceso. Finalmente, la preparación se hizo semipermanente al sellar los límites del cubreobjetos con barniz para uñas (transparente). De las preparaciones

obtenidas se analizaron en un microscopio óptico (Zeiss) con contraste de fase en objetivos 40X y 100X, núcleos con nucléolos vacuolizados, abarcando los subestadios profásicos desde leptoteno hasta diacinesis.

El porcentaje de nucléolos vacuolizados se evaluó en 181 núcleos provenientes de 20 individuos de *P. laevigata*, obteniendo el número promedio de vacuolas nucleolares y su tamaño relativo. A fin de realizar el análisis de la dinámica vacuolar se designaron unidades arbitrarias para evaluar cualitativamente las dimensiones de las vacuolas presentes, en la perspectiva de establecer correlaciones importantes con la compleja dinámica de los cromosomas meióticos. Así, considerando el porcentaje de espacio ocupado por cada vacuola en el área total del nucléolo y su nitidez al microscopio, se definieron cuatro clases de vacuolas o espacios claros: difuso (D), significa que estas estructuras no se observaron bien delimitadas, bien definidas o no estuvieron presentes; chica (Ch), se consideró que una vacuola ocupa un área menor al 10 %; mediana (M), cuando comprendía más del 10 al 25 %; y grande (G), mayor al 25 %.

7.2 Extendido de Microsporocitos e Impregnación Argéntica.

En el procedimiento para obtener imágenes bidimensionales por extendido en superficie y secado al aire de los microsporocitos primarios de *P. laevigata*, se siguió el protocolo propuesto por Tapia *et al.* (1995) y que es una modificación a las metodologías propuestas por Schwarzacher y Schweizer

(1986) y, Geber y Schweizer (1988), mismas que incluyen la liberación e hinchamiento de los microsporocitos mediante un pretratamiento enzimático, choque hipotónico y extendido. Esta metodología ha mostrado ser útil para la observación del complejo sinaptonémico y estructuras accesorias, por tanto, en esta investigación fue utilizada con la finalidad de identificar los cromosomas nucleolares, las regiones NOR, así como para describir brevemente la topografía del nucléolo mediante el revelado por impregnación argéntica.

De 20-30 botones (que provienen de inflorescencias en las que previamente se han determinado los estadios de profase) se colocaron en un vaso de precipitado de 25 ml que contenía 10 ml de solución enzimática (pectinasa 20% v/v + celulasa 2% p/v) en amortiguador de citratos pH 4.2, y con tijeras finas se procedió a dispersar mecánicamente el material a fin de liberar las células meióticas; a continuación, el material permaneció en una estufa durante 30-40 minutos a 37° C.

Posteriormente, con una pipeta Pasteur se colectó el sobrenadante y se centrifugó por 10 minutos a 1700 r.p.m., a fin de sedimentar las células y desechar el sobrenadante. Al botón celular se le añadieron 7 ml de solución fresca de KCl 0.0075 M y se incubó a 37° C durante 40 minutos; pasado este tiempo, nuevamente se centrifugó a 1700 r.p.m. y se retiró el sobrenadante.

El botón celular fue lavado resuspendiendo en solución KCl y se centrifugó; esta operación se repitió dos veces. Posteriormente se realizó la

fijación y el lavado del material con solución Farmer, agregando lentamente 6 ml al botón celular y se centrifugó; esta operación se repitió 2 veces más.

El material se resuspendió en fijador y con la ayuda de una pipeta Pasteur se tomó una muestra, dejando caer de 1-2 gotas sobre un portaobjetos limpio y esperando que seque al aire. Posteriormente a la laminilla se le agregaron 2 gotas de AgNO_3 al 50 % y se colocó un cubreobjetos. La laminilla se expuso durante 30 minutos a una lámpara de luz de 125 V, después de lo cual se retiró el cubreobjetos, sumergiendo la laminilla en agua destilada y enjuagando abundantemente; se dejó secar nuevamente al aire.

Una segunda impregnación de la laminilla, se realizó colocando 2 gotas de plata amoniacal y una gota de formalina neutralizada con acetato de sodio, cubriéndola rápidamente con un cubreobjetos. En el momento en que la preparación se tornó amarilla ámbar (0-60 segundos) se sumergió en agua destilada a fin de retirar el cubreobjetos, detener la impregnación y eliminar el exceso de colorante; la laminilla posteriormente se dejó secar al aire (Bloom y Goodpasture, 1976; Quack y Noel, 1977; Fletcher, 1979; Tapia *et al.*, 1992).

La revisión de las preparaciones se realizó con un microscopio óptico (Zeiss) con objetivo 100X en campo claro y contraste de fase. Se analizaron 15 células de núcleos típicos de cada subestadio de la profase meiótica.

8.-RESULTADOS

8.1 Técnica Estándar

Las preparaciones revelan un proceso meiótico normal en términos de la formación de 14 bivalentes con un comportamiento típico de una especie diploide, lo cual permitió una rápida identificación de los subestadios profásicos. En el núcleo celular, luego de la tinción, tanto los cromosomas como el nucléolo se presentan heteropícnóticos positivos, presentando un buen contraste en relación al nucleoplasma, facilitándose la observación adecuada de sus características.

En células profásicas de *P. laevigata*, fue característica la presencia de un solo nucléolo que se apreció como una estructura de forma esférica bien delimitada de tono rosa/violeta pálido, presentando en su interior estructuras de un tono más claro o translúcido, vistas como espacios claros que pueden ser identificadas fácilmente, ya que se asemejan a vacuolas por la forma de globo que presentan en general y son bien diferenciadas en contraste con el resto del cuerpo nucleolar. Tales espacios claros varían en número y tamaño en función del estadio profásico en que fueron caracterizados: el material cromatínico se distinguió en la etapa temprana de profase (leptoteno) constituyendo filamentos largos y delgados, mismos que conforme progresaba la profase fueron condensándose hasta alcanzar una forma compacta en las etapas meióticas

medias y tardías. Aprovechando particularidades en el comportamiento cromosómico, se identificaron con relativa facilidad los cinco subestadios, así como los cambios intranucleolares de la profase meiótica, que a continuación se describen.

La profase empieza en la etapa de leptoteno, en donde se observó un alto porcentaje de nucléolos con una tinción homogénea. No obstante algunos otros, presentaban dentro de la estructura nucleolar zonas de tinción clara difusas de formas no definidas y que quizá den inicio de que es en este estadio cuando comienza el proceso de formación de vacuolas. El juego cromosómico se observa como largas y finas hebras distribuidas por todo el núcleo y rodeando al nucléolo.

Durante el zigoteno, dentro de los nucléolos se observó espacios claros con formas más definidas, esto es, se distinguió un contorno que delimita las zonas claras de aquellas zonas teñidas que las rodean; donde la mayoría de estos espacios tienen forma circular, dando el aspecto de vacuola distribuidas indistintamente en la estructura nucleolar (Fig. 1a). Los nucléolos observados se caracterizaron por el gran número de vacuolas encontrándose desde una hasta diez, predominando aquellas de tamaño chico. En muchos casos, se observó que estos cuerpos se interponen entre sí. En relación al comportamiento cromosómico, éstos se observaron más compactados y se pudo visualizar con gran claridad un bivalente con constricción secundaria y porción satélite ubicado exactamente en el interior de una vacuola nucleolar, en

tanto que el resto de los bivalentes no han logrado la sinapsis total y se encuentran cercanos al nucléolo permaneciendo en la periferia del mismo (fig. 1b).

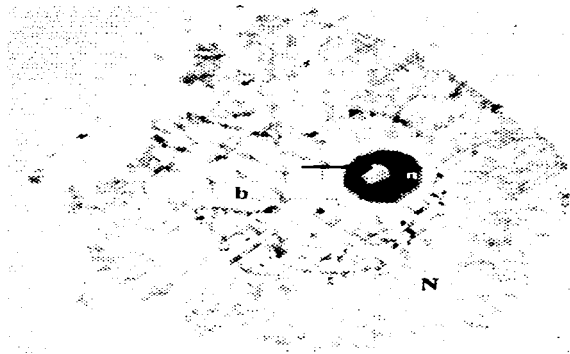


Fig.-1a. Núcleo (N) zigoténico de *P. laevigata* presentando una vacuola mediana (flecha) de forma circular rodeada por el componente nucleolar (n) correspondiente a la zona de color oscura. Se distinguen los bivalentes (b) bien separados y rodeando al nucléolo.



Fig.-1b. Núcleo (N) profásico (zigoteno) de *P. laevigata* teñida con aceto-carmin exhibiendo la estructura de la región NOR sobre en una pequeña vacuola del nucléolo (n). Se observa al bivalente (b) parcialmente sinaptado en la región telomérica, mostrando la constricción secundaria (flecha) visible en ambas cromátidas hermanas y su correspondiente porción satélite.

En paquiteno, los nucléolos presentaron por lo general, una vacuola de gran dimensión ubicada en el centro abarcando gran parte del área nucleolar, en otros casos, el número es de una a tres vacuolas estando presente por lo menos una de gran tamaño (Fig. 1c). En correlación con el comportamiento de los cromosomas se distinguieron filamentos más gruesos (sinapsis total) con una distribución por todo el núcleo o concentrados en un polo, pero siempre se distinguió por lo menos, un bivalente unido al nucléolo.

En los estudios de la profase tardía, correspondiente a diploteno, se apreció una disminución del tamaño de los espacios claros dentro del nucléolo y un incremento en su número (de una a cinco) predominando aquellos de talla chica. Por su parte, los bivalentes sufrieron la desinapsis, esto es, los cromosomas homólogos se separaron uno de otro hasta cierto punto, permaneciendo unidos por quiasmas dando formas semejantes a anillos o de cruz y se encuentran distribuidos en todo el núcleo (Fig. 1d).

Finalmente, en la última subfase de la profase correspondiente a diacinesis (etapa de transición a la metafase I), los nucléolos se observaron poco contrastantes con el nucleoplasma y el aspecto de las vacuolas no está bien definido, mostrando un cuerpo apenas observable (Fig. 1e). El comportamiento del complemento cromosómico es similar al observado en la subfase anterior, aunque cabe señalar que el criterio del grado de nitidez (difuso) de la morfología del nucléolo permitió salvar la limitante de distinguir el estadio

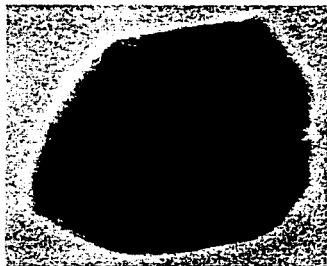


Fig.-1c Núcleo (N) de microsporocito de *P. luevigata* en paquiteno con nucléolo (n) presentando una vacuola (v) de gran dimensión.

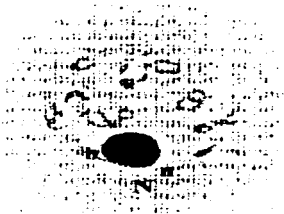


Fig. 1d. Imagen de un núcleo (N) en profase tardía (diploteno), cuyo nucléolo (n) contiene vacuolas de diversos tamaños distribuidas indistintamente en su interior. Se observan tres bivalentes (b) cercanos al nucléolo.

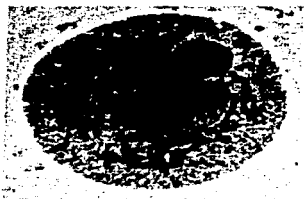
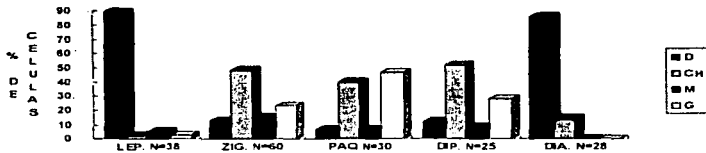


Fig.-1e. Estructura nuclear en diploteno/diacinesis mostrando los bivalentes (b) desinaptados parcialmente y la estructura nucleolar conteniendo una vacuola (v) reducida en tamaño para después desaparecer.

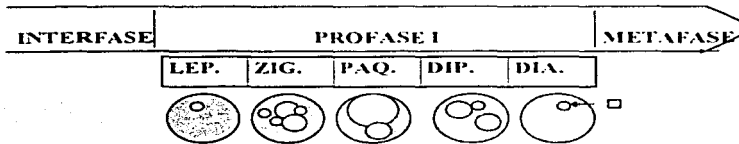
Del número total de células observadas se obtuvo el porcentaje de la unidad arbitraria de cada subfase, por tanto, los datos se llevaron a una gráfica de distribución, donde los cambios significativos observados en el nucléolo se representan por las barras de frecuencia (gráfica 1), y esta actividad nucleolar es ilustrada en el esquema uno de los cambios que sufren los espacios claros o vacuolas en el transcurso de la profase meiótica.

Actopan, Hgo.



Gráfica 1.-Muestra el número de células (N) observadas en cada una de las subfases meióticas con el porcentaje obtenido de la unidad arbitraria (D, Ch, M y G) de vacuolas observadas.

MEIOSIS



Esquema 1.- Cambios en el interior del nucléolo (cuadrado) apreciables en el transcurso de cada una de las subfases de la profase, los cuales pudieran representar el desarrollo de un ciclo vacuolar con formación, crecimiento y desaparición. Las vacuolas (flecha) se observan en el microscopio óptico como espacios claros con la técnica del colorante básico e impregnación de plata.

8.2 Impregnación de Plata: estructuras reveladas por microscopía de luz

En cuanto a la impregnación argéntica, ésta reveló características de la topografía nucleolar, como son los sitios de actividad de sus constituyentes y la interacción con regiones particulares de los cromosomas nucleolares (banda NOR). Así, el nucléolo se impregnó de manera diferencial, observándose en su interior áreas contrastadas: una de color ámbar (amarillo o dorado) de tono claro y otra de color obscuro (café o negro), lo cual facilitó la caracterización e identificación de los posibles sitios de transcripción de ARN ribosomal (ARNr), así como la ubicación de la región NOR en el complemento cromosómico de *P. laevigata* en profase meiótica.

El comportamiento de los componentes nucleolares se infiere siguiendo la impregnación de las sales de plata, donde el nucléolo profásico es visto como un cuerpo redondo en la subfase de leptoteno, teniendo un color ámbar brillante o amarillo dorado, dando la apariencia de un sol con pequeños manchones o puntos de color café claro ubicados en la parte concéntrica, que al transcurrir la profase, gradualmente aumentan en superficie hacia la periferia, así como en intensidad de color. Los cromosomas meióticos, se distinguieron como filamentos largos y delgados presentando una coloración ámbar, y distribuidos a través del núcleo y por lo menos un bivalente se encuentra unido a la estructura nucleolar.

En zigoteno, se observan dentro de la estructura nucleolar dos tonalidades más definidas de color en la misma proporción, teniendo una apariencia granulosa, ocasionada por un fondo de tono ámbar conteniendo más extendidos y con más intensidad de color, los manchones o puntos de color café, distinguiéndose espacios claros diminutos en la parte central del nucléolo, siendo referidos como intersticios. Por su parte, los cromosomas se observan más compactados y formando una maraña, encontrándose polarizados en un extremo del núcleo o rodeando al nucléolo. En este estadio es evidente la presencia de la banda NOR, como una estructura circular bien definida en el extremo de uno de los bivalentes. Dentro de la estructura nucleolar, éstos se distinguieron por la presencia de dos puntos negros abultados en la parte terminal de los brazos de los cromosomas homólogos de color ámbar y en algunos casos se observan apareándose ambos filamentos de manera intersticial (Fig. 2a).

En paquiteno, algunos nucléolos se aprecian total o parcialmente de tono café/negro, esto es, la tonalidad oscura se incremento dentro del nucléolo cubriéndolo totalmente, en otros, se observaron dentro de la impregnación intersticios de color ámbar o el borde del nucléolo presenta una coloración más clara, rodeando la zona oscura. La región organizadora nucleolar observable en este subestadio, se distingue como un punto negro en el filamento del cromosoma bivalente de color ámbar, ya con sinapsis total, asociado a la estructura nucleolar (Figs. 2b y 2c).

En los estadios tardíos de la profase meiótica (diploteno-diacinesis) los bivalentes se encuentran condensados y desinaptados parcialmente, manteniéndose unidos por los quiasmas; por tanto, se observan dos puntos oscuros que corresponden a la región NOR de un bivalente, que se encuentran asociados al nucléolo. El color de impregnación del nucléolo en la fase terminal de la profase, se presenta una disminución de su tono oscuro, tanto en extensión como en su tonalidad, adquiriendo la apariencia de los subestadios tempranos (Fig. 2e). En otras estructuras nucleolares la impregnación persiste, observándose un nucléolo totalmente negro. Es importante hacer notar que en el transcurso de la profase con la técnica de impregnación de plata, las vacuolas nucleolares no son muy notorias y ocasionalmente pocas pudieron ser apreciadas dentro de la estructura nucleolar, por lo cual fue difícil seguir el comportamiento de las mismas (Fig. 2d).

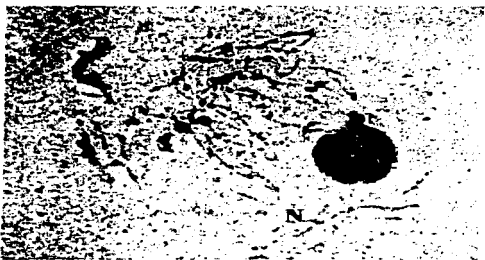


Fig.-2a Nucleo (N) en zigoto con la estructura nucleolar (n) con apariencia granulosa observándose áreas impregnadas de plata (zonas oscuras), así como el bivalente (b) portador de la región NOR unido al nucleolo



Fig. 2b. Impregnación argéntica de un núcleo (N) paquítenico de *P. laevigata* donde claramente se aprecian los bivalentes (b) totalmente apareados y se muestra claramente en la parte terminal de uno de ellos (flecha) la región NOR. Asimismo, se distinguen dentro del nucléolo (n) una impregnación diferencial (zona oscura en la parte central y más clara hacia la perifera)



Fig.-2c Núcleos (N) en paquiteno observándose el cromosoma bivalente (b) que porta la región NOR (punto negro) que se identifica inequívocamente en los estrófidos debido a su asociación con el nucleolo (n)

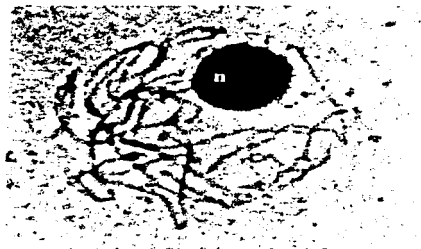


Fig.- 2d Nucleolo (n) en paquiteno mostrando estructuras vacuolares (v) reveladas con impregnación de plata. Pocas preparaciones pudieron ser apreciadas, por lo que fue difícil seguir el comportamiento de las mismas

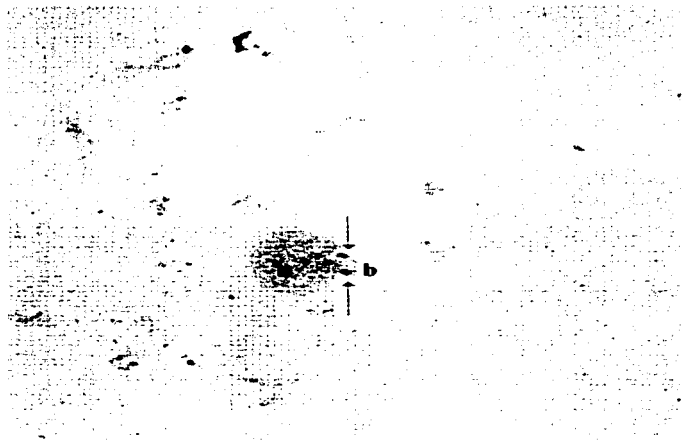


Fig.-2e. Durante los estadios tardíos de la profase (diploteno-diacinesis), en la estructura nucleolar (n) se distingue la unión de un bivalente (b) parcialmente desinaptado portando en cada brazo la región NOR correspondiente (flechas)

9.-ANALISIS DE RESULTADOS

9.1 Dinámica Vacuolar

Tal como se describió en un apartado anterior, el nucléolo se observa como un organelo que sufre cambios, pudiendo éstos ser monitoreados por la calidad de coloración adquirida con la técnica de tinción e impregnación, permitiendo ver de ésta manera algunas estructuras propias como la dinámica nucleolar, así como otras asociadas, que son las regiones organizadoras nucleolares.

El nucléolo se observa como un organelo conspicuo en algunas fases del ciclo celular, donde se presenta como un cuerpo heterogéneo por la presencia de las áreas claras, por lo que para su estudio estructural se utilizó la combinación de técnicas convencionales, el extendido celular en superficie previamente descritas y la impregnación argéntica. Esto permitió el análisis citogenético del nucléolo en cuanto al seguimiento de la dinámica vacuolar, determinación del número de la región NOR y su correspondencia con cambios en la conducta nucleolar en células meióticas de *P. laevigata*, que como se reportó previamente presenta el inconveniente de poseer un número relativamente alto de cromosomas ($2n=28$) y con talla demasiado pequeña (0.6-1.3 μ m), de lo cual dificulta la realización de estudios como el aquí propuesto.

Aun más, las investigaciones citogenéticas incluyen especies que por sus características nucleares y cromosómicas son accesibles a análisis convencionales (núcleos grandes, complementos cromosómicos de gran tamaño y bajo número) (Walter y Bertke, 1979). Aunado a lo anterior, la mayor parte de las metodologías propuestas para el análisis de características más específicas del núcleo y nucléolo están dirigidas a la preparación de material que se observa a nivel de microscopía electrónica.

Las preparaciones obtenidas en este trabajo para microscopio óptico mostraron núcleos profásicos con una muy buena calidad de extendido y con un fondo limpio, donde los subestadios profásicos son fácil y rápidamente identificables, siendo relativamente sencillo identificar un solo nucléolo en las preparaciones meióticas trabajadas con ambas técnicas, en este sentido, Greebaun *et al.* (1986) han señalado un número variable de pequeños nucléolos profásicos en relación directa con el progreso de la meiosis. De este modo, los caracteres de la dinámica nucleolar, además de considerarse como buenos marcadores genéticos pueden ayudar a definir estadios profásicos particulares.

Se señala que en algunas especies vegetales y animales, donde se ha observado los procesos involucrados en el origen y formación del nucléolo, fenómeno conocido como nucleologénesis, éste involucra la fusión de dos o más pequeños nucléolos hasta formar uno, siendo el que comúnmente se aprecia durante la interfase de ciclo celular (Dolezel *et al.*, 1981; Jordan y Cullis, 1982).

En núcleos de células de *P. laevigata* en todos los subestadios analizados únicamente se observó la presencia de un solo nucléolo, que dentro de su estructura contiene espacios claros; característica que corresponde a lo que Ortiz *et al.* (1979) y Mailliet (1978) describen como nucléolos reticulados, en donde el componente fibrilar y granular forman una red o malla (características no observables con las técnicas usadas), en el cual se encuentran embebidos espacios claros para constituir en conjunto el nucleolonema. Por otra parte, la ultraestructura del nucléolo es más bien constante en una gran variedad de plantas y animales (Lanfontain y Lord, 1965; Jordan y Cullis, 1982), pero su organización, es decir, el arreglo de sus componentes fibrilar, granular y filamentos de ADN (Fig. 3), puede variar de célula a célula, lo que caracteriza a diferentes tipos de nucléolos (Mailliet, 1978; Jordan y Cullis, 1982).

Dentro del arreglo estructural nucleolar, se observaron espacios claros de tamaño variable y numerosos, que Goessens (1984) refiere como intersticios nucleolares o vacuolas nucleolares. Sin embargo, Jordan y Cullis (1982) manejan el término vacuola, como más indicativo para aquellos espacios claros de mayor tamaño y forma redonda. En cambio, el término intersticios es más indicativo para aquellos espacios diminutos de formas no redondas y diferente a las vacuolas (fig. 3) (Jordan, 1991). En los meiocitos de *P. laevigata* tales características pudieron distinguirse luego de la impregnación de plata, los intersticios se observan como pequeñas manchas (puntos) irregulares de color ámbar claro embebidos en las áreas de color oscuro y las vacuolas se ven de gran tamaño, contrastantes con las áreas que la rodean. Estas estructuras en los

últimos años han llamado la atención de los citogenetistas en relación a su forma y función, mencionándose como estructuras que no son permanentes dentro del nucléolo en células animales y vegetales (De Barsy *et al.*, 1974; Moreno Díaz de la Espina *et al.*, 1980).

La presencia de vacuolas dentro del nucléolo han sido descritas en muchos trabajos, pero no se ha llegado a un acuerdo en su función. Algunos autores correlacionan la vacuolización y actividad nucleolar: Esper (1965) observó que estas vacuolas aparecen al mismo tiempo que principia la síntesis de ARN, y Chouinard (1965) menciona que en la construcción de nucléolos telofásicos se ha observado que se forma primero el componente fibrilar (el cual dará origen al granular) y por último se formarán las vacuolas. En cambio, en otros estudios experimentales se ha mostrado que en células inmaduras poco activas, se distinguen vacuolas de gran dimensión cuando se inhibe la síntesis de ARN (Smetana *et al.*, 1968).

Por otra parte, se ha propuesto que los espacios claros que se forman en el nucléolo, denominados vacuolas, sean zonas de depósito de los precursores ribosómicos y/o de transporte al citoplasma (Kuroiwa y Tanaka; 1971. Rose *et al.*, 1972; Moreno Díaz de la Espina *et al.*, 1980); también se considera que la presencia de estas estructuras sea el resultado de una pérdida de material nucleolar que no es inmediatamente remplazado (De Barsy *et al.*, 1974; Goessens, 1984). Con lo anterior y luego del seguimiento de los espacios claros en nucléolos de *P. laevigata*, éstos corresponderían a estructuras de almacenaje

de productos de la síntesis de ARNr cuyo máximo se alcanza en el subestadio de paquiteno (áreas vacuolares vistas de gran tamaño), donde posteriormente en la fase terminal de la profase, la estructura vacuolar experimenta un retroceso a su forma inicial, es decir, se fragmenta y se reducen en tamaño hasta desaparecer.

En base a lo mencionado anteriormente acerca del contenido vacuolar, se ha demostrado la existencia de diferentes productos como fibras de cromatina y filamentos de proteínas (Smetana *et al.*, 1968), así como estructuras semejantes al componente granular, análogos en tamaño a los ribosomas citoplásmicos (Puvion *et al.*, 1979; Moreno Díaz de la Espina *et al.*, 1980). Cuando estas vacuolas están presentes, se ha observado que el tamaño del nucléolo decrece como resultado de la pérdida de material de este organelo (Rose *et al.*, 1972; De Bary *et al.*, 1974).

Así, dadas las funciones y características topográficas de este organelo intranuclear se ha podido establecer que las vacuolas nucleolares no son estructuras estáticas, ya que como se mencionó anteriormente y como se pudo apreciar claramente en los núcleos profásicos de *P. laevigata*, experimentan cambios drásticos que reflejan una dinámica estructural compleja. En relación a lo anterior, la cantidad de vacuolas presentes en la etapa temprana de la profase, fue numerosa con la característica de tener un tamaño pequeño. Moreno Díaz de la Espina *et al.* (1980) suponen que las pequeñas vacuolas se fusionan y dan origen a una de mayor tamaño. A partir de las observaciones

aquí reportadas se puede decir que conforme transcurría la profase temprana (leptoteno/zigoteno) se aprecia un mayor número de vacuolas, en tanto que durante el paquiteno se apreció una sola y de gran tamaño. A este respecto, ya fue mencionada la posibilidad de fusión vacuolar, luego de la cual se realiza una fragmentación de las mismas. Lo anterior podría presentarse en *P. laevigata* ya que en la profase tardía (diploteno/diacinesis) se apreciaron nuevamente varias vacuolas pequeñas como al inicio de la etapa meiótica, haciendo suponer la existencia de un proceso de carácter cíclico, en estrecha relación con cambios conformacionales y bioquímicos del material hereditario.

Algunos autores especulan, que eventos tales como el patrón especial de pliegamiento cromosómico presináptico, el alineamiento cromosómico y el entrecruzamiento (crossing-over) son estructuras sintetizadas de novo, donde se involucra la síntesis sostenida de proteínas especiales durante el desarrollo de la profase (Stern y Hotta, 1973; Loidl, 1990).

Es así como los cambios cuantitativos y cualitativos de las vacuolas durante el transcurso de la profase meiótica podrían considerarse como indicadores de la maduración de ciertos estadios, pues en otras investigaciones se han reportado casos similares: en huevos inmaduros (ovocitos) se presentan pequeñas y numerosas vacuolas, comparado con un huevo terminal y maduro, que presenta una vacuola central de gran tamaño (Esper, 1965); por otra parte, en nucléolos de *Allium cepa*, las vacuolas pequeñas se pierden en la profase

temprana y las vacuolas de gran dimensión en la profase tardía (Chouinard, 1965).

En *P. leavigata*, el seguimiento de los cambios intranucleolares apreciados durante el transcurso de la profase meiótica pueden representar el desarrollo de un ciclo vacuolar no descrito anteriormente en especies del género *Prosopis*. Asimismo, con el uso de la técnica de tinción carmín se observó lo que otras investigaciones han reportado acerca de la existencia de un par cromosómico asociado al nucléolo (Tapia *et al.*, 1993) y otro par que presenta microsátelites (Hunziker *et al.*, 1986). Cabe señalar que además de las anteriores características, en esta investigación se confirma la presencia de un bivalente con constricción secundaria y porción satélite que se encuentra constantemente unido al nucléolo y se presentan evidencias contundentes que soportan la afirmación de que dicha región porta los genes ADN ribosomal (ADNr) (fig. 3). Este hallazgo exhibe a *P. leavigata* como una especie en la cual se cumple la generalidad acerca de la relación CS/NOR (Funaki *et al.*, 1975; Cuñado *et al.*, 1985).

9.2 Modelo de Impregnación y Bandas NOR

En relación a la región organizadora nucleolar y estructura del nucléolo, Stahl *et al.* (1991) señalan que las células germinales en la profase meiótica son particularmente apropiadas para investigar la actividad de transcripción en la formación del nucléolo. La relación entre NORs cromosómicos y nucléolo es

particularmente obvia en estas células, pues la transcripción de ADN_r es intensa durante la meiosis particularmente en la profase temprana. En este contexto, la variación numérica y ubicación estructural de NORs en cromosomas nucleolares explica su utilidad en investigación citotaxonomía y filogenética (Langer y Koul, 1983; Hamal, 1986)

En consecuencia es importante el seguimiento o mapeo físico en complementos cromosómicos tanto en células animales como vegetales de la región NOR, como ya se mencionó, presenta una estrecha correlación con el nucléolo y con cromosomas específicos, estos últimos conocidos como cromosomas NOR (o cromosomas nucleolares). Uno de los métodos que se emplean para estudiar estas relaciones es la impregnación con sales de plata, técnica selectiva conocida como banda NOR, utilizada para definir o ubicar a los genes que codifican para la formación del nucléolo (Bloom y Goodpasture, 1976; Fletcher, 1979; Howel y Black, 1980; Hizume *et al.*, 1980); esta técnica puede ser usada en combinación con otras (bandeado G), por ejemplo en células humanas (Tuck-Muller *et al.*, 1984) y en células vegetales (Schubert, 1984).

El modelo de impregnación con sales de plata en la estructura nucleolar observado en esta investigación es similar al reportado por otros autores (Loidl y Grzilhuber, 1983; Medina *et al.*, 1986; Stahl *et al.*, 1991). Luego de la impregnación, el núcleo toma una coloración amarillo ámbar claro en cuyo interior el nucléolo se identifica como un cuerpo ámbar brillante con manchas

oscurecidas, esto último debido a la especificidad de la plata con afinidad hacia algunas proteínas presentes en la estructura nucleolar (Ochs *et al.*, 1985). Estas proteínas juegan un papel en la descondensación y transcripción del NOR cromosómico (Hofgärtner *et al.*, 1979; Medina *et al.*, 1986). Para algunos autores, las áreas impregnadas, así como la intensidad de la misma representa una medida de la actividad nucleolar (Hofgärtner *et al.*, 1979). En cambio para otros, la impregnación representa sólo un marcador de los sitios donde se lleva a cabo la transcripción, es decir, los centros fibrilares (Stahl *et al.*, 1991).

Para los fines de este trabajo, la impregnación de plata es utilizada para visualizar con mayor detalle la topografía nucleolar sin intentar definir la composición estructural del nucléolo. Stahl *et al.* (1991), Busch y Smetana (1970), mencionan que en el transcurso de la profase, se tiene una gran actividad transcripcional durante los estadios de leptoteno a zigoteno y ésta empieza a disminuir en paquiteno; en relación y concordante a lo anterior, los nucléolos en células de *P. laevigata* experimentan un aumento de impregnación de sales de plata en los primeros subestadios de la profase, hasta alcanzar un máximo en paquiteno, manteniéndose en algunas estructuras nucleolares hasta diploteno-diacinesis. En otros nucléolos de la profase tardía, se distingue una disminución de las áreas de impregnación por el aumento de las áreas de color ámbar. Estas diferencias se observan en la estructura nucleolar en la profase tardía, en relación con la condensación del complemento cromosómico, afectando la velocidad de síntesis de ARNr, pero mientras el nucléolo persista se tiene producción de ribonucleoproteínas (Busch y Smetana, 1970)

Asimismo, en la estructura nucleolar impregnada con plata, se notaron intersticios de tamaño y forma pequeña con color ámbar, áreas ausentes de sales de plata que corresponden a cromatina condensada (Lanfontain y Chouinard, 1963; Haaf *et al.* 1984; Medina *et al.* 1986), o sitios con características de contenido similar a la matriz nucleolar (zonas proteicas no bien definidas) (Jordan y Cullis, 1982) y zonas claras vistas como vacuolas que corresponden a zonas diferenciadas a la actividad transcripcional, por lo que estas estructuras vacuolares no tienen participación en la síntesis de ARNr y por lo común se encuentran en el componente granular (Stahl *et al.*, 1991)

En cuanto al cariotipo meiótico de *P. laevigata*, Tapia *et al.* (1993) describieron la asociación de un par cromosómico cercano a la estructura nucleolar, en tanto que en el cariotipo somático no precisan de manera definitiva el número de cromosomas con porción satélite. Aunque se conoce la estrecha correlación entre cromosomas con constricción secundaria y la porción satélite con zonas del organizador nucleolar, la evaluación de estas últimas es más confiable mediante el revelado de las bandas NOR (Cuñado *et al.*, 1985). El empleo de sales de plata, posibilita de manera confiable, la identificación y cuantificación de los NOR (Howell and Black, 1980; Schubert, 1984), con ventajas importantes sobre las técnicas de tinción convencionales, aún en cromosomas de escasa talla (Funaki *et al.*, 1975).

En efecto, la observación al microscopio reveló claramente la presencia de una sola región NOR asociada con una constricción secundaria y que se localiza en la porción terminal (telomérica) en uno de los bivalentes. Los subestadios de zigoteno y paquiteno se presentaron como los más favorables pues en éstos la región NOR se aprecia como un pequeño abultamiento y en ocasiones un bivalente en la parte final del filamento presenta una pequeña esfera embebida en el nucléolo (figs. 2b y 2c). Los resultados obtenidos en la localización de los NORs, vienen a corroborar la propuesta de Cuñado *et al.* (1985) y Medina *et al.* (1986) donde los procedimientos con la técnica de plata para localizar la región organizadora nucleolar, ésta puede ser impregnada en todos los estadios meióticos, proporcionando nuevos marcadores citológicos, principalmente en aquellas especies en la cual algunas técnicas no son capaces de identificar cromosomas del complemento.

Por otra parte, la técnica argéntica permitió apreciar un patrón de impregnación que correlaciona, según lo reportado en la bibliografía (Loidl and Grzilhuber, 1983; Medina *et al.*, 1986; Stahl *et al.*, 1991), con un evento característico del núcleo meiótico: la transcripción intensa del ARN, relacionada con la síntesis de estructuras relevantes para el adecuado desarrollo de la profase meiótica en general y del entrecruzamiento genético o crossing-over en particular (Loidl, 1990; Offenberger *et al.*, 1991).

Finalmente, cabe mencionar que los resultados obtenidos con la combinación de las metodologías empleadas, ponen de manifiesto características no reportadas en la citogenética de *P. laevigata* y que ahora deberán considerarse como marcadores fidedignos para realizar estudios comparativos que arrojen luz sobre la evolución y filogenia del género *Prosopis*.

Lo anterior toma mayor relevancia, ya que hasta el momento no habían sido obtenidas imágenes semejantes en núcleos meióticos para especies de este género, y además pone de manifiesto las ventajas que presentan la combinación de metodologías utilizadas aquí, lo que contribuye a resolver una de las problemáticas relacionadas al estudio citogenético de especies pertenecientes al género *Prosopis*.

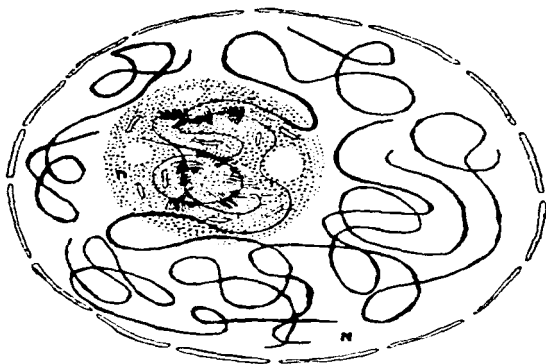



Fig.-3. Esquema de un núcleo (N) con nucleolo (n) reticulado típico, que muestra los diferentes componentes de la estructura nucleolar (tomado de Jordan, 1987 y 1991)

FILAMENTOS DE ADN 

CENTRO FIBRILAR 

COMPONENTE FIBRILAR DENSO 

COMPONENTE GRANULAR 

INTERSTICIOS 

VACUOLA NUCLEOLAR 

10.-CONCLUSIONES

Las técnicas empleadas en este trabajo prueban ser útiles para el estudio de características citogenéticas tales como el ciclo vacuolar, la topografía del nucléolo y la identificación de la banda NOR, que anteriormente no podían ser observadas con metodologías convencionales.

Del trabajo realizado se concluye que los cambios observables de los espacios claros en el transcurso de la profase meiótica, representan el desarrollo de un ciclo vacuolar no descrito anteriormente para especies del género *Prosopis* y escasamente estudiado en otras especies vegetales, mismo que efectivamente correlaciona con los cambios en la morfología de los cromosomas y por tanto pueden considerarse como marcadores asociados a un determinado estadio de la profase para esta especie.

Con la impregnación argéntica, el comportamiento nucleolar en células de *P. laevigata*, presenta un patron de actividad de transcripción cíclico de ARN, pues al inicio de la profase la actividad nucleolar va en aumento hasta alcanzar un máximo en paquiteno, para posteriormente disminuir dicha actividad transcripcional conforme se aproxima a los subestadios de la profase tardía.

En el complemento cromosómico de *P. laevigata* se observó únicamente uno de los bivalentes meióticos que es un portador de una banda NOR, en este caso asociado a una constricción secundaria y a una porción satélite.

En los microsporocitos de *P. laevigata* fue difícil establecer una diferencia clara entre los subestadios de diploteno y diacinesis, pues a diferencia de otras especies vegetales (como en el caso de maíz o tomate) y quizá debido a su pequeña talla en los bivalentes, no se aprecian marcadas diferencias en el grado de condensación de la cromatina; sin embargo, el criterio de la morfología del nucléolo permitió salvar dicha limitante.

La descripción de estos caracteres citogenéticos pueden ser comparados intra e interespecíficamente para el género, constituyendo una herramienta útil en el esclarecimiento de problemas taxonómicos del mismo, incluso en la evolución de su cariotipo. La información básica obtenida en la presente investigación señala un punto de partida para la realización de otras investigaciones con especies vegetales en las que se dificulta su estudio citogenético.

• 11.-LITERATURA CITADA

- Azkue, D. y Jones, G. H., 1993. Inter and intra-plant SC length variation in *Crepis capillaris*, *Heredity*, 71, 363-368.
- Bhargava, J., Engebrecht, J. A., y Roeder, G. S., 1992. The rec 102 mutant of yeast is defective in meiotic recombination and chromosome sinapsis, *Genetics*, 130, 59-69.
- Bloom, S. E., y Goodpasture, C., 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer region in human chromosomes, *Hum. Genet.*, 34: 199-206.
- Busch, H. y Smetana, K., 1970. The Nucleolus, Ed. Academic Press, New York and London, 625 p.
- Burkart, A., 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (*Leguminosae*, subfam. *Mimosoideae*), *J. of the Arnold Arboretum*, 57: 217-231.
- Carpenter, T.C., 1988, Thoughts on recombination nodules, meiotic recombination and chiasmata, in: Genetic recombination, Kucherlapati, R. and Smith, G. R. (Eds) A. S. M., Washington, D. C., 529-548.
- Chouinard, L. A., 1965, Nucleolar Architecture in Root Meristematic Cell of *Allium cepa*, International Symposium The Nucleolus, Its Structure and Function, Monograph 23, (Eds. Vincent, W. S. and Miller, O. L., Jr.), 125-140.

- Cuñado, N., Cermeño, M.C. y Orellana, J., 1985, Nucleolar organizer activity at meiosis in wheat-rye hybrid plants., *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 227-233.
- De Barsy, T. H., Deltour, R. y Bronchart, R., 1974, Study of nucleolar vacuolation and RNA synthesis in embryonic root cell of *Zea mays*, *J. Cell Sci.* 16: 95-112.
- Dolezel, J., Chalikova, J. y Zakahlenjuk, O. V., 1989, Sequential estimation of nuclear DNA and silver staining of nucleoli in plant cells, *Stain Technology*, 4:9-13.
- Esper, H., 1965, Studies on the nucleolar vacuole in the oogenesis of *Arbacia punctulata*, *Experimental Cell Research* 38: 85-96.
- FAO, 1982, Las leguminosas en la nutrición humana. Alimentación y Nutrición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 20, 134 p.
- Felker, P., 1979, Mesquite: an all purpose leguminous arid land tree. In: *New Agricultural Crops*. Ritchie, G. A. (ED). American Association for the Advancement of Science Symposium, Vol. 38 Westview Press, Boulder, Colorado, USA.
- Fletcher, J. M., 1979, Light microscope analysis of meiotic prophase chromosomes by silver staining, *Chromosoma* 72:255-261.
- Frias, H. J., Peña, C. J. y Ocampo, J., 1992, Comparación de dos metodologías de remoción de leña en árboles de mezquite (*P. laevigata*) en zonas áridas del norte de Guanajuato, *Manejo de Pastizales*, 6: 1-8.

- Funaki, K., Matsui, S. y Sasaki, M. 1975. Location of Nucleolar Organizer in Animal and Plant Chromosomes by Means of an Improved N-banding Technique. *Chromosoma* 49: 357-370.
- García, V. A. 1990. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Universidad Autónoma de Chapingo. 3ra edición, 143 p.
- Galindo, A. S., García, M. E. y Wend, T. L. 1992. Potencial de hibridación natural en el mezquite (*Prosopis laevigata* y *P. glandulosa* var. *Torrellana*, *Leguminosae*) de la altiplanicie de San Luis Potosí. *Acta Botánica Mexicana*, 20: 101-117.
- Geber, G. y Schweizer, D. 1988. Cytochemical heterochromatin differentiation in synapsis alba (*Cruciferae*) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant. Syst. Evol.* 158: 97-106.
- Goessens, G., 1984. Nuclear Structure. International Review of Cytology. 87, 107-158.
- Gómez, L. F. 1970. Importancia económica de los mezquites (*Prosopis Spp.*) en algunos estados de la República Mexicana. Ediciones del Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A.C., México, D.F., 1-70 p.
- Grant, F., 1987. Genome differentiation in higher plants, in: Differentiation patterns in higher plants. Urbank, K. M. (Ed). Academic Press, London.
- Greenbaum, Y. F., Hale, D. W., y Fuxa, K. P., 1986. The mechanism of autosomal synapsis and the substaging of zignonema and pachynema from deer mouse spermatocytes. *Chromosoma*, 93: 203-212.

- Haaf, T., Schindler, W. D. y Schmid, M., 1984, Specific silver staining of experimentally undercondensed chromosome regions, *Chromosoma* 90: 149-155.
- Hamal, A., 1986, Nucleolus Organizing regions in *Apiaceae* (*Umbelliferae*). *Plant Systematics and Evolution* 154:11-30.
- Heslop-Harrison, J. S., 1991, The molecular cytogenetics of plants, *Journal of Cell Science* 100:15-21.
- Hizume, M., Sato, S. y Tanaka, A., 1980, A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plant, *Stain Technology*, Vol. 55, No. 2, 87-90.
- Hofgärtner, F. J., Schmid, M., Krone, W., Zenzes, M: T. y Engel, W., 1979, Pattern of Activity of Nucleolus Organizers During Spermatogenesis in Mammals as Analyzed by Silver-Staining, *Chromosoma* 71, 197-216.
- Howell, W. y Black, D., 1980, Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36, 1014-1015.
- Hunziker, J. H., Naranjo, C. A., Palacios, R. A., Poggio, L. y Saidmann, B. 1986, Studies on the taxonomy genetic variation and biochemistry of Argentine species of *Prosopis*, *Forest Ecology and Management*, 16, 301-315.
- Johnson, J. M., 1969, A study of nucleolar vacuoles in cultured tobacco cells using autoradiography, actinomycin-D, and electron microscopy, *J. Cell Biol.* 43, 197-206.
- Jordan, E. G., 1987, At the heart of the nucleolus, *Nature*, 329: 489-490.

- Jordan, E. G., 1991. Interpreting nucleolar structure: where are the transcribing genes ?
Journal of Cell Science 98, 437-442.
- Jordan, E. G. y Cullis, C. A. 1982. The Nucleolus. Society for Experimental Biology
Seminar Series; 15, Great Britain. 218 p.
- Kenton, A., Rudall, P. J. y Johnson, A. R. 1986. Genome size variation in *Sisyrinchium L.*
(*Tridaceae*) and its relationship to phenotype and habitat. *Bot. Gaz.*, 147, 342-354.
- Kenton, A., y Drakeford, A., 1989. Genome size and karyotype evolution in *Tradescantia*,
section *Cymbispatha* (*Commelinaceae*). *Genome*, 33, 604-610.
- Kohlmann, B. 1993. El análisis de las zonas híbridas y la evolución. En Tópicos de Biología
Evolutiva, Diversidad y adaptación. (Eds: Nuñez Farfán y Cordero). 1ra Ed.
Centro de Ecología, UNAM. 105-128.
- Kuroiwa, T. y Tanaka, N., 1971. Fine Structures of Interphase Nuclei. The morphological
classification of nucleus in interphase of *Crepis capillaris*. *Cytologia*, 36, 143-160.
- Lanfontain, J. G. y Chouinard, L. A., 1963. A correlated light electron microscope study of
the nucleolar material during mitosis in *Vicia faba*. *J. Cell Biol.* 17: 167-201.
- Lanfontain, J. G. y Lord, A., 1965. Ultrastructure and mode of formation of the nucleolus in
plant cells; International Symposium The Nucleolus. Its Structure and function,
Monograph 23, (Ed. Vincent, W. S. and Miller, O. L.), 67-21.
- Langer, A., y Koul, A. K. 1983. Studies on Nucleolus and Nucleolar Chromosomes in
Angiosperms VII. Nature of nucleolar chromosome polymorphism in *Allium cepa*
var. *viviparum*. *Cytologia* 48: 324-332.

- Loidl, J. y Grzillhuber, J., 1983, Structural changes of Ag-stained nucleolus organizing regions and nucleoli during meiosis in *Allium flavum*, *Can. J. Genet. Cytol.* 25: 524-529.
- Loidl, J., 1990, The initiation of meiotic chromosome pairing: The cytological view, *Genome*, 33: 759-778.
- Loidl, J., 1991, Coming to grips with a complex matter: a multidisciplinary approach to the synaptonemal complex, *Chromosoma*, 100, 289-292.
- Love, R. y Walsh, R. J., 1968, The relation of nucleolini to nucleolar vacuoles in the living cell, *Experimental Cell Research* 53, 432-446.
- Maillet, M., 1978, Manual de Citología, 1ra. edición, Ed. Toray-Masson, S. A., 254 p.
- Martinez, S., 1984, Arquitectura foliar de las especies del género *Prosopis*, *Darwiniana*, 25 : 279-297.
- Matteucci, S. D., Colma, A. y Acosta, Y., 1991, Potencial productivo de los cujizales en el árido falconiano (Venezuela), *Interciencia*, 16(6), 313-321.
- Medina, F., Solanilla, E. Sánchez, A., Fernandez, E. y Risueño, C., 1986, Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining, *Chromosoma* 94: 259-266.
- Morales de León, J. y Ruiz, G., 1994, El mezquite (chacachaca, chucate, algarrobo, tahicuahuitl). Cuadernos de Nutrición, Vol. 17, No 1, Ene-Feb. 34-38.

- Moreno-Díaz de la Espina, S., Medina, F. J. y Risueño, M. C., 1980. Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells. *European Journal of Cell Biology*; 22, 724-729.
- Mooney, H.A., Simpson, B.B. y Solbrig, O. T., 1977. Phenology, Morphology, Physiology, Mesquite: Its Biology in two Desert Scrub Ecosystem, (Ed. Simpson B. B.), Downen Hutchinson & Ross Inc., Pennsylvania, USA. 26-44.
- Naranjo, C. A., Poggio, L. y Zeiger, E., 1984. Phenol Chromatography, Morphology and Cytogenetics in Three Species and Natural Hybrids of *Prosopis* (*Leguminosae-Amosoidae*). *Plant Systematics and Evolution* 144:257-276.
- Ochs, R.L., Lischme, M.A., Shen, E., Carrol, R. E. y Busch, H., 1985. Nucleologensis: composition an fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* 92:330-336.
- Offenberg, H., Dietrich, A. J., y Heyting, C., 1991. Tissue distribution of two major components of synaptonemal complex of the rat. *Chromosoma*, 101, 83-91.
- Ortiz, V., Alfonso, S., Sagredo, G., Riera, R., y Alvarez, V. 1979. Citología, Ed. Medica y Técnica S. A., 1ra. Edición, España, 467 p.
- Palacios, R. A. y Bravo, D. L., 1975. Estudio morfológico de las semillas de *Prosopis* II: Algunas especies norteamericanas y neotropicales. *Darwiniana* 23(1): 3-35.
- Pelling, C. y Beermann, W., 1965. Diversity and Variation of the Nucleolar Organizing Regions in *Chironomids*. International Symposium The Nucleolus, Its Structure and Function, Monograph 23, (Eds. Vincent, W. S. and Miller, O. L. Jr.), 393-398.

- Poggio, L., Burghardt, A. D. y Johnson, A. R. 1989. Nuclear DNA variation in diploid taxa of *Larrea* (Zigophyllaceae). *Heredity*, 63, 321-328.
- Puvion, E., Bachelier, J. P. y Burglen, M. J., 1979. Nucleolar Perichromatin Granules Induced By Dichlorobenzimidazole Riboside. *J. Ultrastruct Res.* 69, 1-12.
- Quack, B. y Noel, B., 1977. The XY chromosome pair in mouse and human spermatocytes, visualized by silver staining, *Nature*, 267: 431-433.
- Rose, R. J., Setterfield, G. y Fowke, C., 1972. Activation of nucleoli in tuber slice and the function of nucleolar vacuoles. *Exptl. Cell Res.* 71, 1-16.
- Rzedowski, J., 1979. Flora Fanerogámica del Valle de México, 2da. impresión. Ed. Continental. S. A., México. 403 p.
- Rzedowski, J., 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (*Leguminosae, Mimosoideae*) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*, 3, 7-19.
- Saidman, B. O. y Naranjo, C. A., 1982. Variaciones de estereosas en poblaciones de *Prosopis ruscifolia* (*Leguminosae*) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*, 23, 7-19.
- Schwarzacher, R. T. y Schweizer, D., 1986. Synaptonemal complex spreading in plants: technical aspects and preliminary observations on the synaptonemal complex in *Paeonia* and *Ornithogalum*. *Plant. Syst. Evol.* 154: 129-136.
- Schubert, I. 1984. Mobile Nucleolus Organizing Regions (NORs) in *Allium* (*Liliaceae s. lat.*). Inferences from the Specificity of Silver Staining. *Plant Systematics and Evolution* 144, 291-305.

- Signoret, P. J., 1970. Datos sobre algunas características ecológicas del mezquite (*Prosopis laevigata*) y su aprovechamiento en el Valle de Mezquital, Ediciones del Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A.C., México, D. F. , 71-146.
- Simpson, B., 1977. Mesquite. Its biology in two desert ecosystems. Downen, Hutchinson & Ross Inc., Pennsylvania, USA. 1-25.
- Smetana, K., Freireich, E. J. y Busch, H., 1968, Chromatin structures in ring-shaped nucleoli of human lymphocytes, *Exptl Cell Res*, 52: 112-128.
- Solbrig, O. T., Bawa, N. Carman, J. H. Hunziker, C. A. Naranjo, R. A. Palacios, L. Poggio y Simpson B.B. 1977, Patterns of variation. (Ed. Simpson B. B.), Mesquite: its biology in two desert ecosystems. Dowden, Huchinson & Ross Inc. Pennsylvania, USA. 44-60.
- Stahl, A., Wachtler, F., Hartung, M., Devictor, M., Schofer, C., Mosgoller, W., Lanversin, A., Fout, C. y Schwarzacher, H. C. 1991, Nucleoli, nucleolar chromosomes and ribosomal genes in the human spermatocyte. *Chomosome* 101: 231-244.
- Stern, H., y Hotta, Y., 1973. Biochemical control of meiosis. *Ann. Rev. Genet.*, 7: 37-36.
- Tapia, F., Madrigal-Bujaidar, E. y Aguirre, S., 1992, The effect of tequila in the synaptonemal complex structure of mouse spermatocytes. *Mutation Research*, 281:283-286.
- Tapia, F., Monroy, A. y Mercado, P. 1993, Variación en el contenido de ADN según la latitud en tres poblaciones de mezquite *Prosopis laevigata* (Humb. & Boupl. ex Willd.) M. C. Johnst. Memorias del XIII Coloquio de Investigación. ENEP-Iztacala, UNAM. 66 p.

- Tapia, F., Monroy, A., Mercado, P y Zavala, L. 1995, Análisis de la profase meiótica y comportamiento del complejo sinaptonémico en *Prosopis laevigata* (Mezquite) visualizados mediante impregnaciones argentícas. VI Congreso Nacional de Genética, Xalapa, Ver. México. Resúmenes, 65.
- Tuck-Muller, C. M., Bordson, B. L., Kane, M. M. y Hamilton, A. E., 1984, A method for combined C-banding and silver staining. *Stain Technology*, 59, 265-268.
- Walter V. y Bertke, M. 1979, Citología. Ed. Omega S.A. 1ra edición, España. 529 p.
- Winking, H., Reuter, C., y Traut, W., 1993, Meiotic synapsis of homogeneously staining regions (HSRs) in chromosome 1 of *Mus musculus*, *Chromosome Research*, 1993, 137-44.

12.-ANEXO

I.-GENERALIDADES DEL GENERO *Prosopis*

I.1 Distribución del Complejo *Prosopis*

La distribución geográfica actual del género *Prosopis* en América abarca grandes áreas en ambos extremos del eje ecuatorial, presentándose dos focos de importancia: el centro México-Texano y el centro Argentino-Paraguayo-Chileno. El hecho es de que en ambos extremos existen especies endémicas, lo que indica sus antigüedades y cuyo probable origen se remonta a una flora desértica ancestral común para ambas Américas. A este respecto, se ha sugerido que tales ancestros pudieran ser de origen africano, ya que en Africa habita *P. africana*, la especie menos especializada y más mesófila (Rzedowski, 1988).

La presencia del género *Prosopis* en América puede explicarse de acuerdo a la teoría de la Deriva Continental. Algunos hechos indican que el principal centro de diversificación y dispersión es Argentina, porque contiene a la mayoría de las especies (29 de las 42 conocidas) con 14 endemismos, siendo la zona México-Texana un centro de diversificación secundario; aunque Norteamérica, donde existen 10 especies con 4 endemismos, no se descarta como posible centro de origen paralelo al argentino, pues probablemente los ancestros del género llegaron a fines del Cretácico por la ruta Laurasia

meridional y posteriormente migraron hacia el sur experimentando mayor diversificación debido quizá, a que en la región norte se pudo presentar una fuerte competencia con la flora boreal, lo que limitó el proceso de especiación (Burkart, 1976; Rzedowski, 1988).

Burkart agrupa a las especies de Norteamérica en tres líneas evolutivas: la sección *Strombocarpa*, que taxonómicamente es la menos complicada y comprende tres especies; la sección *Prosopisdastrum* incluye una sola especie y finalmente la sección *Algarobia* que comprende 6 especies y es la menos comprendida, pues algunos autores no reconocen para el conjunto más que una sola especie variable, en cambio otros ven hasta 14 (Burkart, 1976; Rzedowski, 1988). Cabe señalar que las especies de la sección *Algarobia* muestran una gran diversidad morfológica, donde se presentan ligeras discontinuidades y frecuentes formas transicionales lo que ha dificultado y/o algunas veces oscurecido la delimitación de las mismas (Hunziker *et al.*, 1986).

En México, las especies del género *Prosopis* se agrupan bajo la denominación común de "mezquites," constituyendo comunidades de amplia distribución geográfica y ecológica (0-2500 m.s.n.m.); *Prosopis laevigata* es el mezquite típico del centro y sur de México (Altiplanicie, depresión del Balsas y planicie costera nororiental); en relación a su morfología y afinidades ecológicas, no se trata de una entidad uniforme, debido a la plasticidad fenotípica manifestada de un sitio a otro (Rzedowski, 1988; Galindo *et al.*, 1992).

1.2 Descripción Botánica

Los mezquites son plantas características de zonas áridas y semiáridas, por lo que son esencialmente termo-xerófilas, siendo en muchos casos el único representante arbóreo de la vegetación (Rzedowski, 1988). Un estudio realizado en nuestro país se ha señalado que condiciones topográficas, climáticas y edáficas pueden influir en la forma de vida de las especies del género: en los sitios con suelo profundo, correspondiente a los valles, el mezquite alcanza frecuentemente un porte arbóreo; tal situación indica casi siempre la presencia de agua freática disponible para las raíces, favoreciendo el desarrollo de árboles que llegan a medir hasta 12 metros. En cambio en las laderas es arbustivo ramificado desde su base, característica de suelos que son aluviales, observándose una proporción de la vegetación arbórea y arbustiva de 1:100 en el Valle del Mezquital. (Signoret, 1970)

A pesar de no ser una entidad uniforme, el mezquite presenta algunas características comunes: presenta un tronco recto, con corteza gruesa de color café-negruzco, algo fisurada, alcanzado un diámetro de hasta un metro, aunque por lo general es de 30 a 60 cm. Es común encontrar árboles torcidos, con ramificación abundante y espinosa lo que le da una aspecto más ancho que alto (Rzedowski, 1979).

Como caracteres foliares presenta hojas bipinnadas de 3.5 a 9.5 cm de largo, con un número de folíolos por pina de 16-33 pares, caducifolio, sus hojas

presentan baja proporción de transpiración. Presenta inflorescencias en espiga de 4 a 10 cm de largo conteniendo de 25 a 300 flores perfectas, de color blanco amarillentas, con características hermafroditas que exhiben protoginia, es decir, el estigma es receptivo antes de que el polen sea liberado, por lo que puede considerarse como flores unisexuales, favoreciéndose de este modo la alogamia. El fruto es una legumbre drupácea de 7 a 20 cm de largo de color café-amarillento, a veces rojizo, tiene forma lineal o curva y presenta un ancho de 8 a 15 mm; sus semillas son de color café claro, más o menos numerosas, con endocarpo segmentado duro, formando una hilera longitudinal (Signoret, 1970; Rzedowski, 1979).

I.3 Datos Fenológicos

En el trabajo realizado por Signoret (1970) sobre algunas características fenológicas del mezquite en el Valle del Mezquital, describe la secuencia de floración y maduración del fruto, donde menciona que en la parte sur ésta se realiza a fines de diciembre y principios de enero, y en la parte norte, empiezan a florecer en febrero-marzo y termina en abril-mayo.

La precipitación pluvial y las aguas lóxicas propician condiciones hidrológicas favorables ampliando el intervalo o periodo de floración, aunque esto podía ser relativo. Se ha mencionado que otros factores como la humedad relativa, la temperatura y el fotoperíodo influyen en la floración, aunque el mezquite tenga contacto con los mantos freáticos, su periodo de floración está

limitado a ciertas épocas. En particular se ha observado que el mezquite arbustivo presenta un período más definido en su floración, cosa que no sucede con el arbóreo (Signoret, 1970).

Por otra parte, durante los meses de enero-febrero se registran el mayor número de heladas, condición que afecta no sólo a la floración sino también la producción del fruto, provocando la caída de la vaina. El desarrollo de la vaina se lleva a cabo inmediatamente que las flores han sido fecundadas, observándose que la maduración de ésta principia en los meses de junio-julio, de tal suerte que ya para los meses de julio-agosto ha adquirido una forma abultada. En la maduración del fruto se apreció una secuencia de sur a norte semejante a la mencionada para el desarrollo de las inflorescencias.

1.4 Importancia Económica

En nuestro país, *Prosopis* es un elemento importante en la flora nacional por ser un recurso biótico con amplia distribución geográfica y ecológica en las zonas áridas mexicanas, las cuales cubren más del 50 % del territorio nacional (Morales de León y Ruiz, 1994; Gómez, 1970). Por otra parte, Rzedowski (1988) menciona que algunos mezquites se caracterizan por su comportamiento agresivo y tienden a ocupar agostaderos, en ocasiones también ocupan tierras de cultivo, reduciendo su valor, por lo que en algunas regiones se aplica mucho esfuerzo y dinero para controlar tales invasiones (Burkart, 1976).

De acuerdo a los datos obtenidos en el estudio de Gómez (1970) sobre la explotación agropecuaria de las zonas áridas mexicanas, se considera a los mezquites como plantas más benéficas que perjudiciales siendo deseable el mejoramiento de las diversas especies de mezquite con fines forrajeros antes que forestales, pues el mezquite mejorado y bien aprovechado podría alcanzar un valor económico superior que al que actualmente tiene.

Por las potencialidades económicas antes mencionadas, su cultivo y mejoramiento se han recomendado en regiones áridas de América, África y la India (FAO, 1982; Burkart, 1976; Felker, 1979; Morales de León y Ruiz, 1994). En nuestro país por ejemplo, Gómez (1970) reporta que los Estados que se distinguen por producción forestal de *P. laevigata* son Sonora, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Zacatecas, Durango, Coahuila, Nuevo León y Puebla.

Con respecto al Estado de Hidalgo, el índice de importancia económica del mezquite en el Valle del Mezquital es bajo y más bien de consumo doméstico, lo cual va en relación con su actual escasez por el uso excesivo de que fue objeto en épocas pasadas y porque la mayoría de los mezquites que existen en la actualidad carecen de la suficiente altura para poderse aprovechar industrialmente (Signoret, 1970).

A pesar de lo anterior, no existen en nuestro país programas de reforestación para el mezquite, tampoco se conocen programas para explotar racionalmente este recurso, a excepción de la iniciativa de un grupo de

productores del Estado de Guanajuato (Sociedad de Solidaridad Social: Tierra, Vegetación y Miel, misma que es apoyada por un grupo de ecólogos) y de un trabajo experimental en campo que evalúa el aprovechamiento integral de este recurso vegetal básico (Frias *et al.*, 1992).

1.5 Usos del Mezquite

En épocas prehispánicas el mezquite constituyó una fuente de obtención de diversos productos para los pobladores de las zonas áridas mismos que actualmente se siguen aprovechando, ya que constituyen una fuente importante de hidratos de carbono y proteínas para grupos humanos del suroeste de Estados Unidos de Norteamérica, norte de México y en la parte sur de América del Sur, donde la harina del fruto se consume bajo diversas formas (Felker, 1979). Por ejemplo, el fruto ya maduro es comestible en estado fresco de sabor agradable o bien se utilizan como golosina y en la preparación de aguas de tiempo. Asimismo, la semilla seca y molida se utiliza como complemento o sustituto del café y de la fermentación de las mismas se obtienen bebidas alcohólicas parecidas al mezcal (Morales de León y Ruiz, 1994).

En general, se reconoce la importancia de las leguminosas leñosas como especies multifuncionales, por lo que las distintas especies del género *Prosopis* son consideradas plantas de gran utilidad, ya que sus hojas y frutos constituyen un forraje de buena calidad para el ganado bovino, ovino y caprino (Matteucci *et al.*, 1991). De su madera se obtienen diversos productos, tales como carbón,

postes para cercas, tablas, hormas para zapato, muebles, etc.; la corteza ha sido utilizada en la curtiduría; la raíz para teñir fibras como algodón, lana y seda, con colores negros y cafés en sus diferentes tonalidades (Signoret, 1970).

En el aspecto medicinal, los retoños, corteza y hojas se utilizan para la preparación de infusiones para afecciones de los ojos, males estomacales y diarrea. La goma en infusiones calientes, se usa para aliviar dolores de garganta y como remedio para problemas respiratorios. La raíz se usa en el tratamiento de hernias umbilicales (Simpson, 1977; Morales de León y Ruiz, 1994).

Las gomas del mezquite, tanto la de semilla como la secretada por el tronco encuentran amplia aplicación y utilidad como sustitutos de la goma arábiga y materia prima en la elaboración de productos farmacéuticos y alimenticios: microencapsulantes, espesantes y edulcorantes (Morales de León y Ruiz, 1994).

1.6 Importancia Ecológica

Los mezquites son una parte integral de los ecosistemas áridos y semiáridos, ya que juegan un papel importante en la estructura de las comunidades naturales, así como en los ciclos hidrológicos: como único representante arbóreo, brinda a otras especies vegetales mejores condiciones para su crecimiento, esto es, tiene la característica de una planta nodriza debido a su capacidad para generar islas de fertilidad, y participa en la formación y

retención del suelo (previniendo el proceso de desertificación). Además, incrementa la fertilidad de los suelos por su capacidad de asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno. Asimismo, ofrece alimento y refugio a una amplia gama de animales silvestres (Signoret, 1970; Simpson, 1977; Frias *et al.*, 1992)

II.-DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO

II.1 Ubicación

El Valle del Mezquital es una región que se encuentra en el centro y suroeste del Estado de Hidalgo y está limitada por la Sierra Madre Oriental al noreste, los Valles del Bajío al oeste y el Valle de México al sur. El Valle del Mezquital comprende algunas divisiones o pequeños valles, uno de ellos es el Valle de Actopan, donde se ubica la comunidad vegetal muestreada y próxima al poblado Santiago de Anaya, localizada a 20° 16' de latitud norte y 98° 54' longitud oeste, a una altitud de 2019 m.s.n.m.

II.2 Composición de la Vegetación

La vegetación es de tipo xerofítico propio de las zonas áridas, formando una comunidad de matorral espinoso con presencia de mezquite (*Prosopis laevigata*), cactáceas (*Opuntia spp.*), huizache (*Acacia spp.*), maguey (*Agave spp.*) y otras (Signoret, 1970).

II.3 Datos Climáticos

El clima dominante de la zona es templado seco, se caracteriza porque la evaporación excede a la precipitación que es de 400 mm y la temperatura

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

media anual de 17°C. (Fuente: Dir. Gral. de Serv. Meteorológicos Nacional; periodo 1985-1991).

En el Valle de Actopan se tiene un máximo de temperatura en mayo (38° C) y un mínimo en enero (6° C); en cuanto a la precipitación, hay un máximo en septiembre y un mínimo en enero, coincidiendo la mínima temperatura con la mínima precipitación, lo que no sucede con tanta precisión en cuanto a la máxima temperatura y máxima precipitación por lo que las plantas quedan sometidas en ese intervalo, a periodos de sequia, cuyo efecto sobre la vegetación se acentúa debido a las elevadas temperaturas (Signoret, 1970).