

Estudio meiótico comparativo en taxones españoles y australianos de *Trifolium subterraneum* L. (♦♦)

M.^á D. ANGULO y A. M.^á SÁNCHEZ DE RIVERA

Instituto de Genética y Antropología. Sección de Citogenética Vegetal.
C.S.I.C., Madrid

RESUMEN

Se presenta un estudio previo comparativo sobre las características meióticas de diez taxones de Trifolium subterraneum L. (cuatro ecotipos españoles y seis cultivares australianos). Los primeros resultados muestran que, en todos los casos estudiados, el número haploide encontrado es $n = 8$ y que este proceso de división transcurre con la mayor regularidad, siendo el equilibrio meiótico un carácter distintivo de estos taxones.

Como ampliación de nuestro trabajo cariológico sobre cuatro ecotipos españoles de *Trifolium subterraneum* L., BA-5, BA-7, BA-8 y CC-2 (ANGULO et al. *Cytologia*, en prensa *), presentamos un estudio previo relativo a las características meióticas de estos ecotipos. Dicho estudio se ha extendido a seis cultivares australianos de la misma especie (*Tallarook*, *Dwalganup*, *Bacchus Marsh*, *Geraldton*, *Clare* y *Yarloop*), con objeto de comprobar si se cumple la previsible identidad meiótica entre ambas procedencias.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de la meiosis en estos taxones ofrece dificultades análogas a las encontradas anteriormente para la mitosis, acrecentadas ahora por la escasez de CMP en *T. subterraneum* y la fugacidad de los estadios meióticos favora-

(*) Trabajo enviado a dicha revista en noviembre de 1973, y que se publica en el vol. 40, núm. 2, correspondiente a junio de 1975.

(**) Trabajo presentado en las XI Jornadas de Genética Luso-Españolas. Barcelona, 15 al 19 de octubre de 1974.

bles para el análisis cromosómico. No obstante, hemos obtenido alguna información sobre el proceso meiótico en tréboles de tan primordial interés pas-cícola.

Las semillas de los ecotipos españoles proceden del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias y las correspondientes a cultivares australianos del Servicio de Semillas Selectas del Ministerio de Agricultura.

Las semillas germinadas en caja Petri fueron plantadas a mediados de octubre de 1973 y cultivadas en invernadero. Las plantas alcanzaron un desarrollo muy vigoroso, y al iniciarse la floración, a primeros del mes de marzo, se realizaron las fijaciones de los capullos florales utilizando como fijador alcohol acético 3:1. La floración duró aproximadamente unos sesenta días.

Los métodos de tinción fueron los de TJIO y LEVAN (1950), y los de ANDERSON et al. (1972) con algunas modificaciones.

Las microfotografías se obtuvieron con fotomicroscopio Carl Zeiss y en contraste de fase.

OBSERVACIONES

Los estudios iniciales sobre meiosis de cuatro ecotipos españoles de *T. subterraneum* L. denominados BA-5, BA-7, BA-8 y CC-2, muestran que este proceso de división transcurre con gran regularidad en todos ellos, siendo el equilibrio meiótico su principal característica.

Se ha podido determinar, a través del estudio de CMP, que, como se suponía, los cuatro ecotipos presentan el número haploide $n = 8$, que es el básico del género. (Fig. 1, núm. 1; fig. 2, núm. 5; fig. 3, núm. 9, y fig. 4, números 13 y 14.)

El hecho de la regularidad meiótica es un carácter común a los cuatro ecotipos que presentan también gran similitud en su estructura cromosómica. Los procesos de apareamiento meiótico son totalmente normales, destacando la uniformidad en la formación de bivalentes, ya que dichos ecotipos, sin excepción, muestran 8 II, no habiéndose observado univalentes ni asociaciones multivalentes. Tampoco se han encontrado cromosomas supernumerarios que fueron detectados en otras especies de *Trifolium* emparentadas con *T. alexandrinum* (PTIJEVSKY AND KATZNELSON, 1970).

Las microfotografías que se acompañan (figs. 1-4) presentan ejemplos de la regularidad y equilibrio meiótico propio de estos ecotipos de *T. subterraneum*, habiéndose podido obtener de todos ellos fases muy similares —prometafasas y metafases I— que muestran la configuración normal de los bivalentes, y también metafases II (figs. 1, 2, 3 y 4, núms. 4, 8, 12 y 16) donde se observan el número de cromosomas y se manifiesta la misma regularidad.

Intentamos determinar el número de quiasmas a partir de metafase I, ya que hasta la fecha no ha sido posible obtener otros estadios meióticos favorables para su identificación. Parece ser que en el ecotipo BA-5 (fig. 1, núms. 2 y 3) el número total de quiasmas es alrededor de 12, y siendo ocho el número de bivalentes en dicho ecotipo, la frecuencia de quiasmas viene a ser de 1,5, aproximadamente.

En el caso de los restantes ecotipos BA-7, BA-8 y CC-2, y conforme a las placas que hemos estudiado, el número y frecuencia de quiasmas parecen ser

los mismos que en BA-5, como puede apreciarse, por ejemplo, en las metafases I de los ecotipos BA-7, BA-8 y CC-2 (fig. 2, núm. 7; fig. 3, núms. 10 y 11, y fig. 4, núm. 15), que permiten observar la configuración de los bivalentes.

En las metafases II (figs. 1, 2, 3 y 4, núms. 4, 8, 12 y 16) también se manifiesta la misma normalidad meiótica.

Hemos destacado en anterior publicación (ANGULO et al., loc. cit.) la elevada productividad de los ecotipos españoles, sobre todo en relación con BA-5 y CC-2, donde los resultados obtenidos fueron muy favorables.

Para comprobar el grado de fertilidad del polen de dichos ecotipos realizamos pruebas de viabilidad mediante las técnicas de tinción de DARLINGTON y LACOUR (1965). Los resultados obtenidos figuran en el cuadro 1 y ponen de manifiesto que, en líneas generales, los ecotipos españoles muestran niveles muy elevados de fertilidad y en todos los casos la viabilidad del polen supera el 95 %. Se destaca a este respecto el ecotipo BA-5, donde se llega casi al 100 %, confirmando sus elevadas condiciones de productividad, considerablemente superiores, que en la mayoría de los cultivares australianos (del orden de un 30 % más productivo que el mejor de éstos).

CULTIVARES AUSTRALIANOS

Al mismo tiempo quisimos verificar, por medio de un estudio comparativo con diversos cultivares de *T. subterraneum* L. procedentes de Australia, alguno de los cuales ya habíamos estudiado (ANGULO et al., 1968), el grado de afinidad meiótica existente entre taxones españoles y de origen australiano.

Con este propósito seleccionamos una serie de seis cultivares entre los cuales, y siguiendo la clasificación de KATNELSON y MORLEY (1965a y b), estuvieran representadas las subespecies de *T. subterraneum* L. establecidas por dichos autores. Hemos estudiado cuatro cultivares de la subespecie *subterraneum* (*Tallarook*, *Dwalganup*, *Bacchus Marsh* y *Geraldton*); uno de la subespecie *brachycalycinum* Katznelson et Morley, cultivar *Clare* y el restante perteneciente a la subespecie *yanninicum* Katznelson et Morley, cultivar *Yarloop*.

El análisis meiótico de dichos cultivares muestra que, como cabía esperar, este proceso de división es de características muy similares a las encontradas en los ecotipos españoles y transcurre con normalidad.

Iniciamos el estudio comparativo a partir de *T. subterraneum* L., subespecie *brachycalycinum* Katz. et Morley, cultivar *Clare*, puesto que los ecotipos españoles, dadas sus características morfológicas, pueden considerarse pertenecientes a dicha subespecie.

La observación de CMP pone de manifiesto que, en principio, el cultivar *Clare* presenta las mismas características meióticas encontradas en los ecotipos españoles.

Presenta número haploide $n = 8$ (fig. 5, núm. 17); manifiesta una gran regularidad en el proceso meiótico; se distingue por la uniformidad en la formación de bivalentes, cuyo apareamiento normal da lugar a 8 II en todas las CMP examinadas (fig. 5, núm. 18), y presenta un número de quiasmas que guarda relación con el estimado para los ecotipos españoles (fig. 5, núm. 19). En metafase II también se observa gran regularidad y el número de cromosomas (fig. 5, núm. 20).

Los cuatro cultivares australianos, incluidos en *T. subterraneum* L., subespecie *subterraneum* (*Tallarook*, *Dwalganup*, *Bacchus Marsh* y *Geraldton*) muestran también características meióticas similares a las encontradas en los taxones anteriormente descritos, cumpliéndose generalmente las mismas condiciones de regularidad y equilibrio.

Se ha podido determinar un número haploide $n = 8$ para *Tallarook* (figura 6, núm. 22); *Dwalganup* (fig. 6, núm. 23); *Bacchus Marsh* (fig. 7, números 25 y 26) y *Geraldton* (fig. 7, núms. 27 y 28).

En las metafases II se manifiesta la misma regularidad meiótica, como vemos, por ejemplo, en el cultivar *Dwalganup* (fig. 6, núm. 24).

También en el cultivar *Yarloop*, perteneciente a *T. subterraneum*, subespecie *yanninicum* Katzn. et Morley (fig. 8, núms. 29 y 30), se ha encontrado el número haploide $n = 8$ y análogas características meióticas que en los anteriores taxones, aunque, en ocasiones, se registra alguna irregularidad meiótica, consistente en la aparición de dos bivalentes retardatarios, los cuales únicamente se observan en la subespecie *yanninicum* (fig. 8, núm. 31) y metafases II, con notoria desincronización (fig. 8, núm. 32).

Dentro del regular comportamiento meiótico de los taxones australianos, encontramos, como única excepción, las anomalías descritas en el cultivar *Yarloop*, mientras los cinco restantes, así como los cuatro ecotipos españoles, presentan notable identidad meiótica, sobre todo en el caso de los taxones incluidos en *T. subterraneum* L., subespecie *brachycalycinum* Katzn. et Morley.

En cuanto al grado de fertilidad de los taxones australianos, hemos podido comprobar, mediante las correspondientes determinaciones en polen, que éstos, en líneas generales, presentan niveles elevados de fertilidad, similares a los encontrados en ecotipos españoles, puesto que en su mayoría superan también el 95 %, como puede verse en el cuadro 2. Las cifras más altas de viabilidad (99,25 %) corresponden al cultivar *Clare*, incluido en *T. subterraneum* L., subespecie *brachycalycinum*, a la que pertenecen los cuatro ecotipos españoles, poniendo de manifiesto, como hecho significativo, que dicha subespecie es la más fértil de las estudiadas tanto en procedencias españolas como australianas.

Los resultados previos obtenidos a través del estudio comparativo de la meiosis de diversos taxones españoles y australianos de *T. subterraneum* L. pertenecientes a tres subespecies, han revelado la estrecha afinidad meiótica que les caracteriza.

Los procesos de división transcurren con toda regularidad y son muy similares, en todos los taxones estudiados, así como la morfología y configuración de los bivalentes.

En ninguno de los ecotipos españoles estudiados se han observado irregularidades en el comportamiento de los bivalentes, cuyo apareamiento transcurre con toda normalidad, poniendo de manifiesto que el equilibrio meiótico es un carácter distintivo de estos taxones.

Todos ellos presentan características meióticas comunes que muestran la afinidad genética de dichos ecotipos, y a su vez manifiestan una estrecha analogía meiótica con los cultivares australianos, en los cuales se cumplen obviamente estas mismas condiciones por la similitud meiótica que presentan entre sí y en relación con los ecotipos españoles, abriendo amplias posibilidades

CUADRO NUM. 1

TAXONES	Origen	Fertilidad del polen				
		Granos contados (n.º)	Fértiles (n.º)	Vanos (n.º)	Fertilidad (%)	Inviabilidad (%)
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>brachycalycinum</i> (BA-5)	ecotipo esp.	503	501	2	99,60	0,39
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>brachycalycinum</i> (BA-7)	ecotipo esp.	513	502	11	97,85	2,14
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>brachycalycinum</i> (BA-8)	ecotipo esp.	523	502	21	95,98	4,01
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>brachycalycinum</i> (CC-2)	ecotipo esp.	537	521	16	97,02	2,97

CUADRO NUM. 2

TAXONES	Origen	Fertilidad del polen				
		Granos contados (n.º)	Fértiles (n.º)	Vanos (n.º)	Fertilidad (%)	Inviabilidad (%)
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>brachycalycinum</i> (Clare)	Cultivar australiano	536	532	4	99,25	0,74
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>subterraneum</i> (Tallarook)	Cultivar australiano	507	502	5	99,01	0,98
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>subterraneum</i> (Dwalganup)	Cultivar australiano	555	543	12	98,36	2,16
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>subterraneum</i> (Bachus Marsh)	Cultivar australiano	529	512	17	96,79	3,23
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>subterraneum</i> (Geraldton)	Cultivar australiano	545	500	45	91,74	8,25
<i>T. subterraneum</i> L. ssp. <i>yanninicum</i> (Yarloop)	Cultivar australiano	546	517	29	94,68	5,31

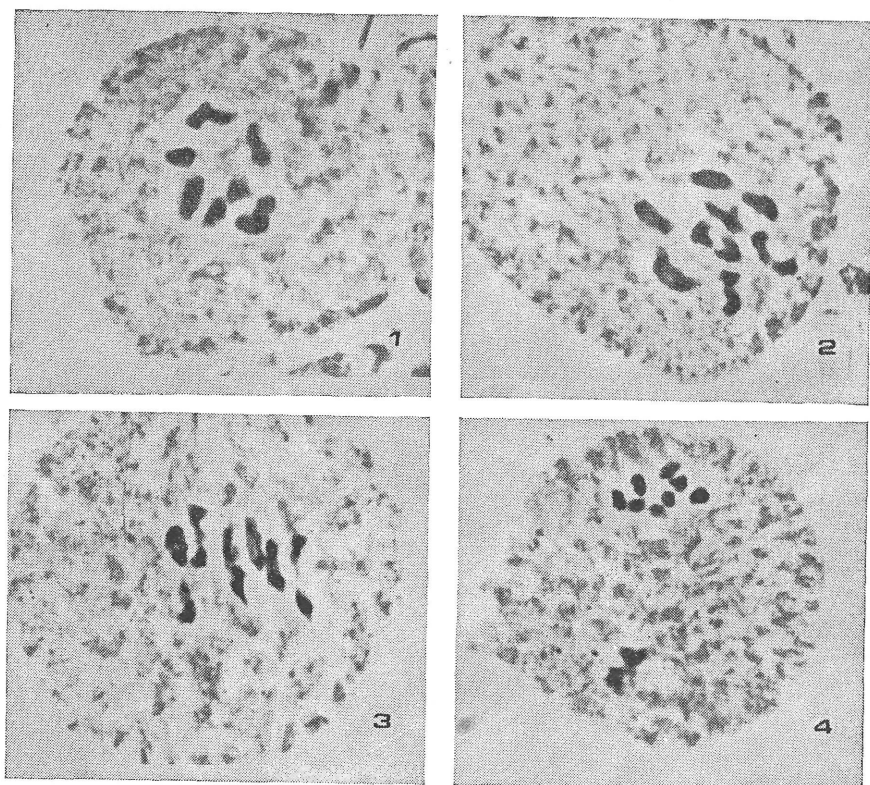


FIGURA I

Meiosis de ecotipos españoles de *T. subterraneum* L. subespecie *brachycalycinum*

ECOTIPO BA-5

- 1) Prometafase con $n = 8$ bivalentes, número básico del género
- 2) y 3) Metafases I con distinta posición de los bivalentes, observándose su configuración y puntos de quiasma
- 4) Metafase II. En la placa metafásica superior se observan con claridad ocho cromosomas que todavía no están insertos en el plano ecuatorial del huso

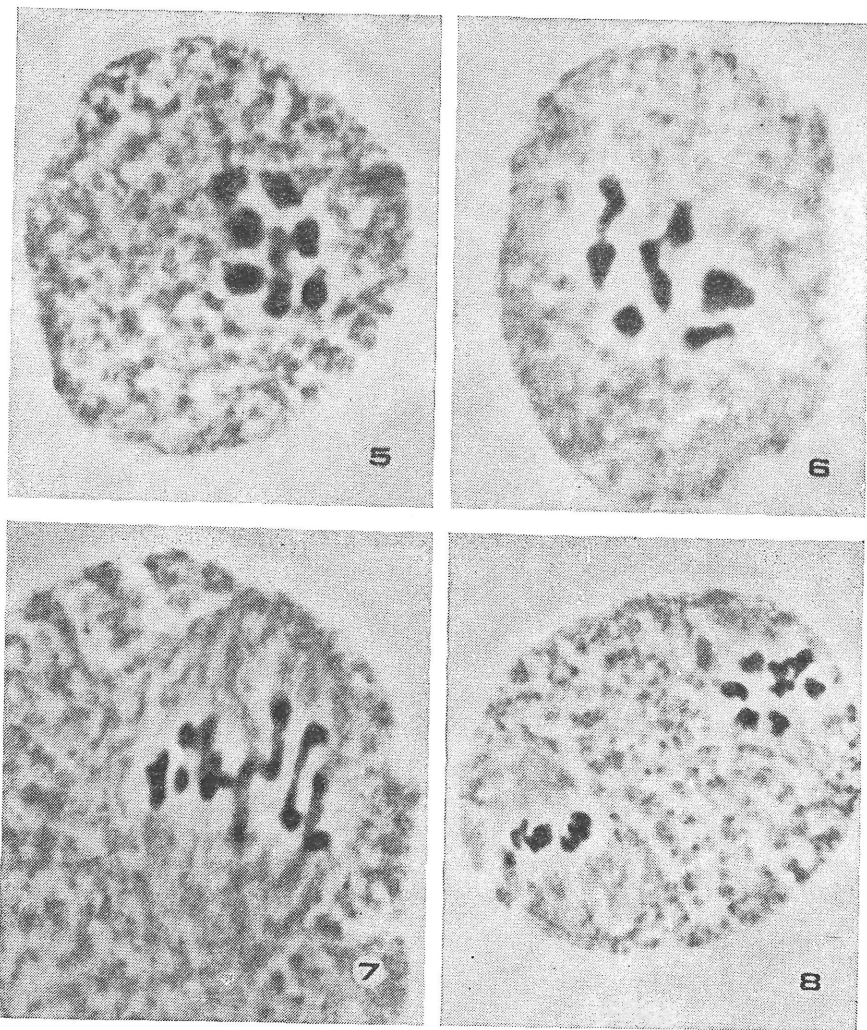


FIGURA II

ECOTIPO BA-7

- 5) y 6) Prometafases con distribución regular de los 8 bivalentes
- 7) Metafase I cuyos bivalentes, una vez coorientados, han iniciado la emigración anafásica
- 8) Metafase II. En la placa derecha aparecen ocho cromosomas todavía no congregados

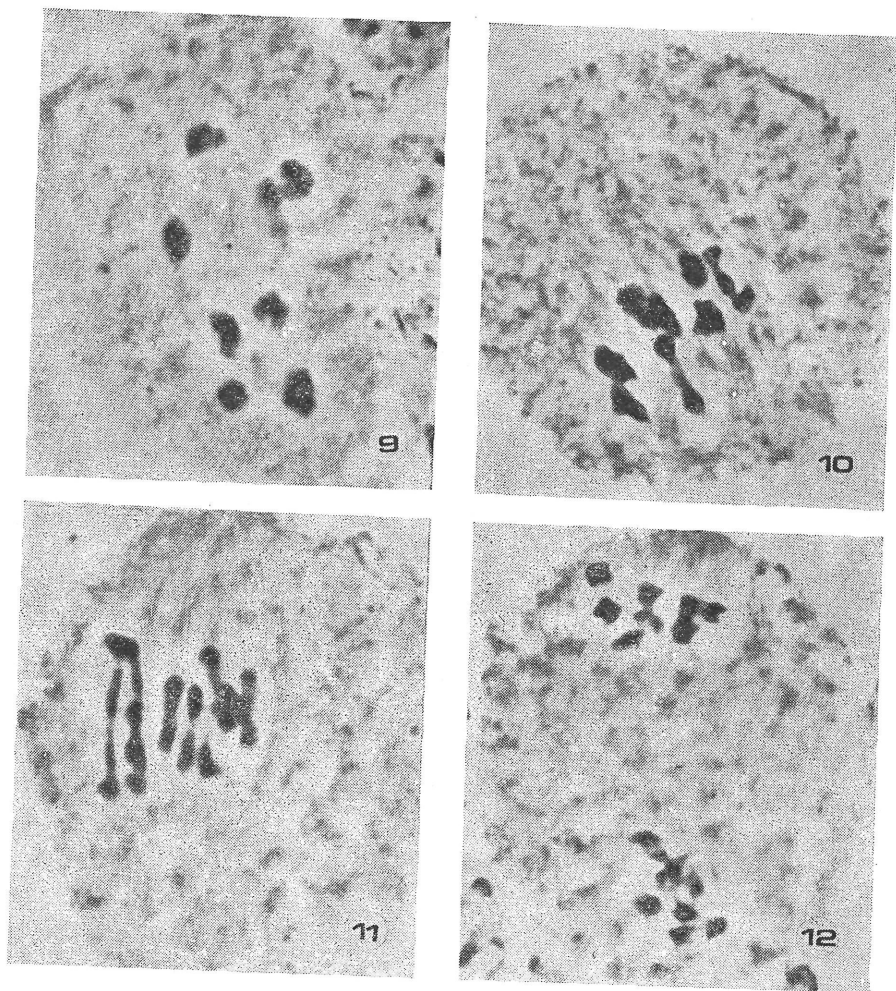


FIGURA III

ECOTIPO BA-8

- 9) Diacinesis que muestra el número básico de cromosomas $n = 8$
- 10) y 11) Metafases I, donde se observan detalles estructurales y quiasmas, así como la regularidad de los ocho bivalentes coorientados con uniformidad, iniciándose la emigración anafásica en la figura 11
- 12) Metafase II mostrando ocho cromosomas sin completar totalmente su inserción en el plano ecuatorial del huso

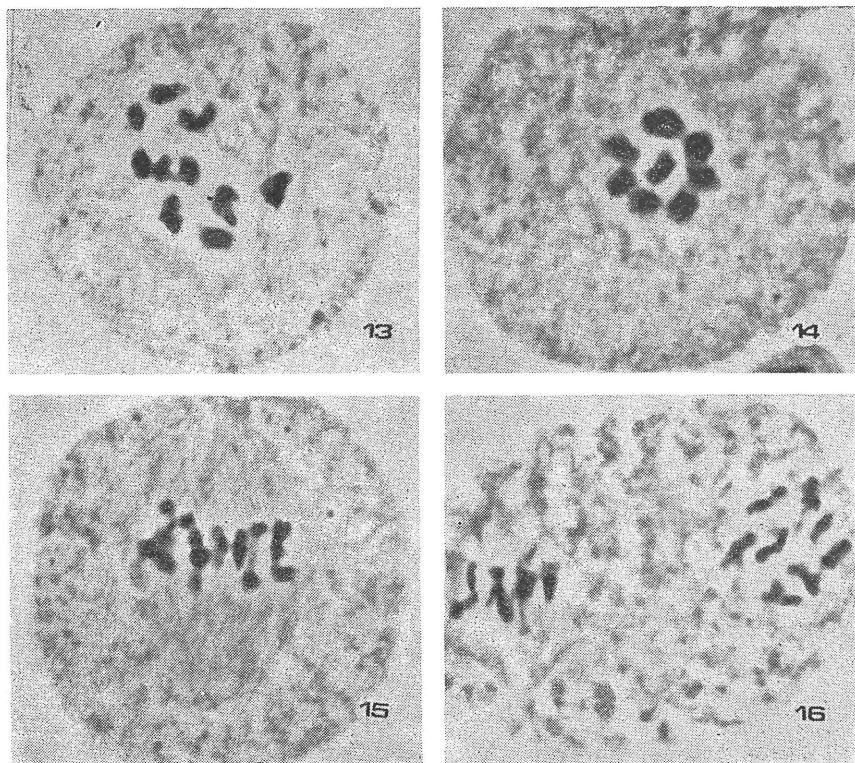


FIGURA IV

ECOTIPO CC-2

- 13) Diacinesis $n = 8$
- 14) Prometáfase avanzada con ligera aglutinación donde se observa el número básico $n = 8$ y la diferencia de tamaño de los bivalentes
- 15) Metafase I, con los ocho bivalentes uniformemente coorientados en el huso acromático
- 16) Metafase II. En la placa derecha se observan ocho cromosomas, que todavía no están insertos en el plano ecuatorial del huso

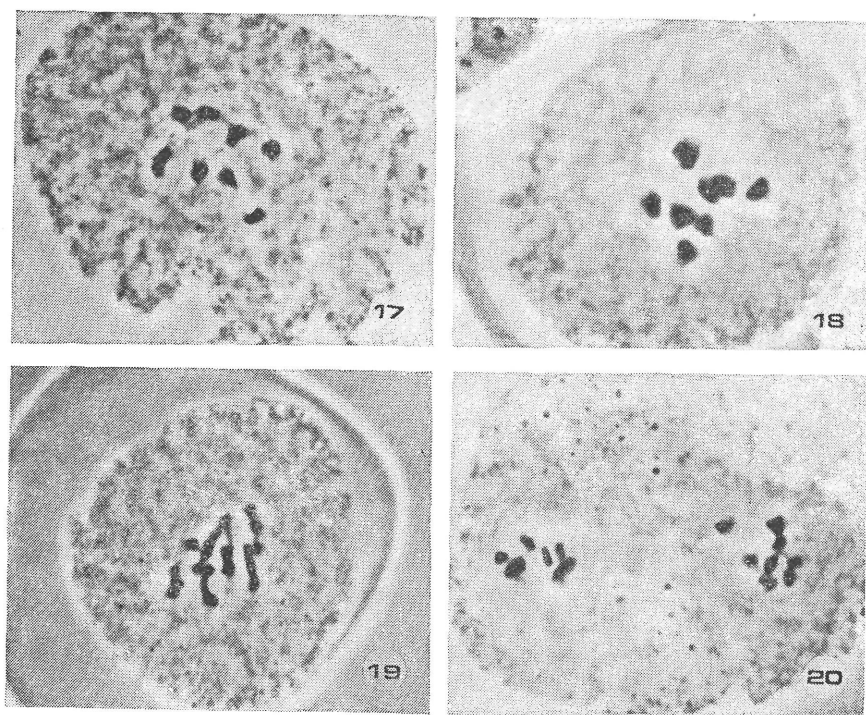


FIGURA V

Meiosis de cultivares australianos de *T. subterraneum* L. subespecie *brachycalycinum*

CULTIVAR CLARE

- 17) Diacinesis $n = 8$
- 18) Prometáfase en que se aprecia el número de bivalentes y las diferentes dimensiones de los mismos
- 19) Metafase I donde pueden observarse algunos detalles de la estructura de los bivalentes
- 20) Metafase II, cuyos cromosomas están completando su inserción en el ecuador del huso

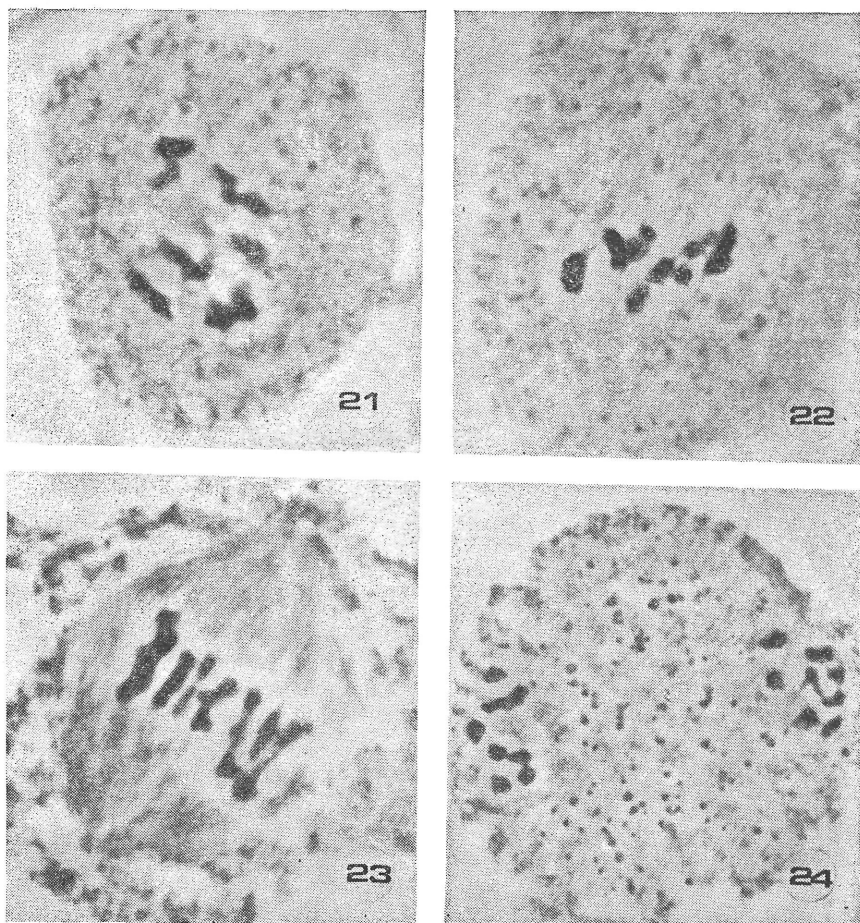


FIGURA VI

Meiosis de cultivares australianos de *T. subterraneum* L. subespecie *subterraneum*

CULTIVAR TALLAROOK

21) Diacinesis $n = 8$

22) Metafase I, $n = 8$ con bivalentes coorientados en la placa ecuatorial

CULTIVAR DWALGANUP

23) Metafase I, $n = 8$ con los bivalentes uniformemente coorientados en la placa ecuatorial, pudiéndose observar su estructura y puntos de quiasma

24) Metafase II, muy regular donde en ambas placas se observan ocho cromosomas distribuidos con uniformidad

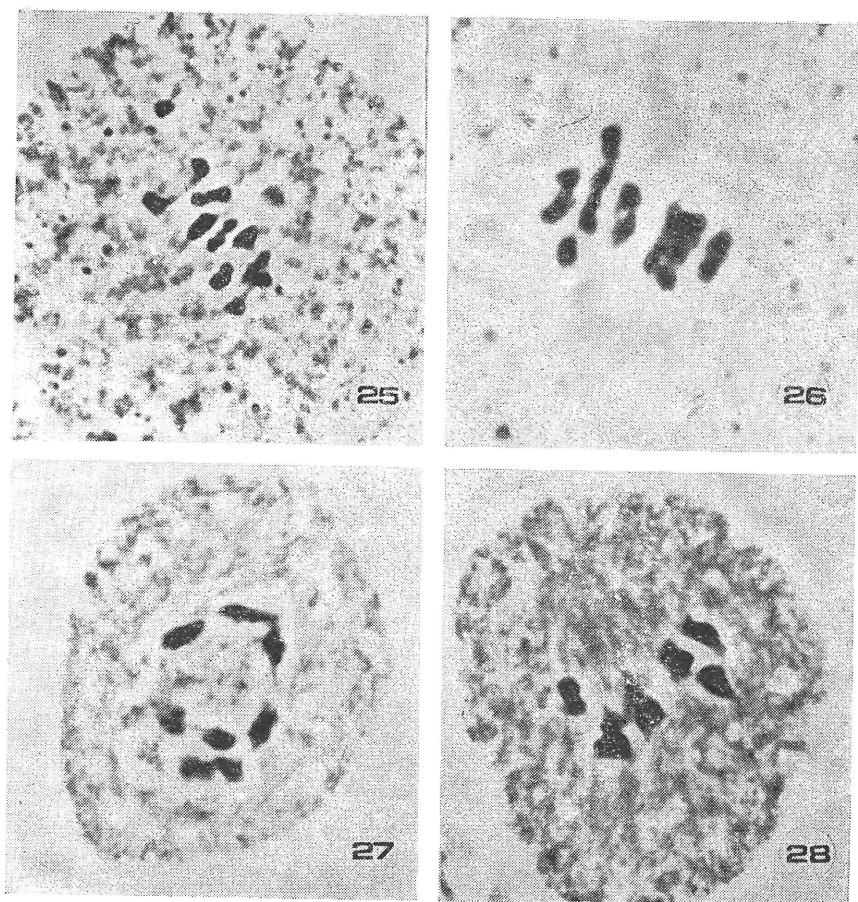


FIGURA VII

Meiosis de cultivares australianos de *T. subterraneum* L. subespecie *subterraneum*

CULTIVAR *BACCHUS MARSH*

25) y 26) Metafasas I, $n = 8$ donde se aprecian la configuración de los bivalentes y puntos de quiasma

CULTIVAR *GERALDTON*

27) Diacinesis $n = 8$ que muestra las características estructurales de los bivalentes y sus ligeras diferencias de tamaño

28) Metafase I, donde se observan 8 bivalentes algo aglutinados

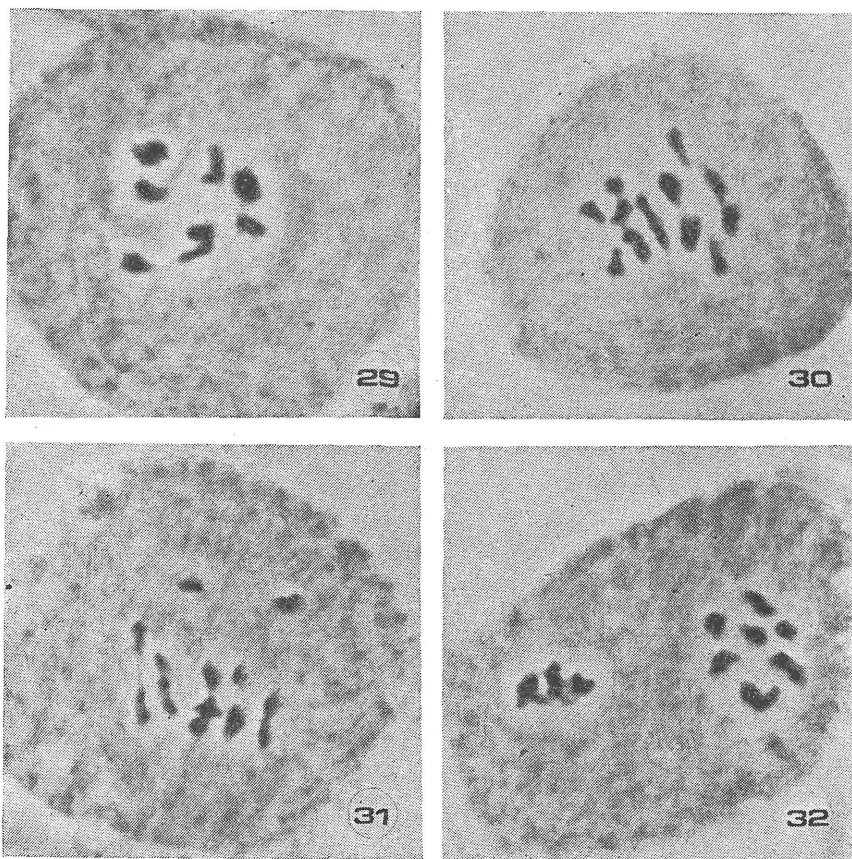


FIGURA VIII

Meiosis de cultivares australianos de *T. subterraneum* L. subespecie *yannicum*
CULTIVAR YARLOOP

- 29) Prometafase, $n = 8$ que muestra las diferencias de tamaño de los bivalentes
- 30) Metafase I, $n = 8$ en que alguno de los bivalentes inicia su emigración anafásica
- 31) Metafase I donde se aprecian detalles de estructura y dos bivalentes retardatarios
- 32) Metafase II desincronizada, que muestra diferencias en la disposición de los cromosomas en su trayectoria de inserción en el plano ecuatorial del huso

dades de cruzamiento entre ambas procedencias para la mejora de la productividad, sobre todo en el caso de los taxones pertenecientes a *T. subterraneum* L., subespecie Katz. et Morley, que presentan tan elevado índice de fertilidad.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ANDERSON, M. K.; TAYLOR, N. L., y COLLINS, G. B., 1972: *Somatic chromosome numbers in certain Trifolium species*. Can. J. Genet. Cytol., 14, 139-145.
- (2) ANGULO, M.D.; SÁNCHEZ DE RIVERA, A.M., y GONZÁLEZ-BERNÁLDEZ, F., 1968: *The chromosomes of Trifolium subterraneum* L., Israel J. Bot. 17: 155-162.
- (3) ANGULO, M.D., y SÁNCHEZ DE RIVERA, A.M., 1974: *Studies on Trifolium subterraneum ecotypes*. Cytologia (en prensa).
- (4) DARLINGTON, C.D., y LA COUR, L.F., 1965: *The handling of chromosomes*, 3rd. ed., London: Allen and Unwin.
- (5) KATZNELSON, J., y MORLEY, F.H.W., 1965a: *Speciation processes in Trifolium subterraneum* L., Israel J. Bot. 14: 15-35.
- (6) KATZNELSON, J., y MORLEY, F.H.W., 1965b: *A taxonomic revision of a sect. Calycomorpbium of the genus Trifolium. I. The geocarpic species*, Israel J. Bot 14: 11-134.
- (7) PUTHEVSKY, E., y KATZNELSON, J., 1970: *Chromosome number and genetic system in several Trifolium species. Related to T. Alexandrinum*. Chromosoma 30: 476-482.
- (8) TJIO, J.H., y LEVAN, A., 1950: *The use of oxiquinoline in chromosome analysis*. With an appendix by Stafelt, M. G. *The effect of oxiquinoline on protoplasmic viscosity*. An. Estac. Exp. Aula Dei. 2; 21-64.

MEIOTIC COMPARATIVE STUDY OF SPANISH AND AUSTRALIAN SUBCLOVER TAXA

SUMMARY

The meiotic characteristics of ten *Trifolium subterraneum* L. taxa (four Spanish taxa and six of Australian origin), are compared.

It has been found that the haploid number is $n = 8$ in every case. The regularity of the division process and the meiotic balance seem to be distinctive characteres of these taxa.