

ESTUDIOS CROMOSOMICOS EN EL GENERO
TRIFOLIUM. IV^o(*)

F. GONZÁLEZ BERNÁLDEZ, A. M.^a SÁNCHEZ DE RIVERA
& M.^a D. ANGULO

Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Sevilla & Instituto
de Genética y Antropología, Sección de Citogenética Vegetal,
C. S. I. C. Madrid

(Recibido el 30 de julio de 1973)

Resumen. Continuamos nuestros trabajos cariológicos sobre *Trifolium* con el estudio citológico de nuevas especies que se hace tan necesario para conocer las tendencias evolutivas del género y las relaciones taxonómicas de las especies. En esta comunicación hemos estudiado las siguientes: *T. squarrosum* subsp. *aequidentatum* (Pérez Lara) Malato-Beliz, *T. glomeratum* L., *T. suffocatum* L., *T. retusum* L. y *T. spumosum* L. Estas especies poseen complemento diploide $2n = 16$ y de todas ellas hemos establecido el correspondiente cariotipo.

Summary. As part of a study of the taxonomic and evolutionary relationships among Spanish species of *Trifolium* the chromosome numbers and karyotype characteristics were determined for the following species, all of which were shown to be diploid ($2n = 16$): *T. squarrosum* subsp. *aequidentatum* (Pérez Lara) Malato-Beliz, *T. glomeratum* L., *T. suffocatum* L., *T. retusum* L. and *T. spumosum* L.

Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia del género *Trifolium* y la utilización de alguna de sus especies se ha impuesto en el sector agrícola. Esto explica la atención dedicada al estudio de estas plantas desde distintos puntos de vista, como por ejemplo el de su constitución citológica. Generalmente, dada la dificultad que ofrece este material, se había

(*) Un avance de este trabajo fue presentado en el XXIX Congreso Luso-Español para el Progreso de las Ciencias, que tuvo lugar en Lisboa del 31 de marzo al 4 de abril de 1970. Dado el retraso considerable en la publicación de aquella comunicación, hemos decidido darla a conocer en esta revista, y a ello se debe el que aparezca aquí como parte IV de la serie, aunque se han publicado ya las partes V (*Bol. Soc. Brot., ser. 2, 45: 253-267, 1972*) y VI (*Lagascalía, 2: 3-13, 1972*).

determinado el número cromosómico de las especies sin llegar a detalles morfológicos ni establecer idiogramas que ordenaran los cromosomas según sus características estructurales. Nosotros intentamos salvar estas lagunas, orientando nuestro trabajo hacia un análisis citológico más afinado de las especies, determinando los tipos cromosómicos y el cariotipo correspondiente a cada una de ellas. Al mismo tiempo nos hemos ocupado de la relación entre constitución cromosómica y tendencias evolutivas del género.

Las especies estudiadas en este trabajo son: *Trifolium glomeratum* L., *T. suffocatum* L., *T. retusum* L., *T. spumosum* L. y *T. squarrosus* subsp. *aequidentatum* (Pérez Lara) Malato-Beliz. Estas dos últimas presentan particular interés porque se carecía de información sobre las características citológicas de sus cariotipos, que han quedado establecidos por nosotros mediante sus correspondientes idiogramas.

Los números cromosómicos de las tres primeras especies fueron indicados por PRITCHARD (1969), sin determinar los caracteres morfológicos de los cromosomas. Más recientemente, CHEN & al. (1971) publicaron los cariotipos de dichas especies, si bien *T. retusum* aparece en su trabajo bajo el nombre de *T. parviflorum*. Con este último nombre había asignado KARPECHENKO (1925) el número diploide $2n = 16$ a *T. retusum*.

En cuanto a *T. squarrosus* subsp. *aequidentatum* (Pérez Lara) Malato-Beliz, sabemos que han surgido divergencias de orden sistemático en torno a su clasificación y teníamos interés en estudiar dicha especie desde el punto de vista citológico. MALATO-BELIZ (1968) da cuenta de la presencia en Portugal por primera vez de este taxon, que habían confundido otros autores con *T. obscurum* Savi.

MATERIAL Y METODOS

Indicamos a continuación las especies estudiadas, así como la procedencia de las muestras.

T. glomeratum L. (carretera de Tordesillas, Valladolid).

T. suffocatum L. (alrededores de Elvas, Portugal).

T. retusum L. (alrededores de Elvas, Portugal).

T. spumosum L. (alrededores de Elvas, Portugal).

T. squarrosus subsp. *aequidentatum* (Pérez Lara) Malato-Beliz (semillas recolectadas en los alrededores de Elvas, Portugal).

Las técnicas citológicas empleadas fueron las de TJIO & LEVAN (1950) con pretratamiento de oxiquinoleína de 2 a 4 horas. Las microfotografías se hicieron con fotomicroscopio Zeiss con contraste de fase. Para la medida de los cromosomas se siguió, en líneas generales, el método de ROTHFELS & SMINOVITCH (1958) simplificado por BEMPONG &

SINK (1968). En la identificación del cariotipo hemos seguido a LEVAN (1964) e ISING (1967).

Hemos adoptado, para las subdivisiones del género, la clasificación de VICIOSO (1953) y, para las especies, la nomenclatura de COOMBE (1968), siguiendo en el caso de *T. squarrosum* subsp. *aequidentatum* el criterio de MALATO-BELIZ (1968).

OBSERVACIONES

T. glomeratum L.

Especie perteneciente a la Sect. *Amoria* (Subsect. *Micranthemum*) que según las tendencias evolutivas en *Trifolium* está considerada como de las más primitivas del género, y por tanto, dada su posición taxonómica, era de esperar, en apoyo de nuestra hipótesis de trabajo (ANGULO & al. 1969, 1970), que tuviera un número cromosómico $2n = 16$, como efectivamente se ha demostrado.

Hemos clasificado los cromosomas de *T. glomeratum* en grupos, atendiendo a los tipos estructurales determinados por la posición del centrómero, y hemos encontrado la siguiente distribución:

- Grupo A) *Cromosomas con centrómero en posición mediana.*
3 pares de homólogos con pequeña diferencia de tamaño (V), (v) y (v').
- Grupo B) *Cromosomas con centrómero en posición submediana.*
4 pares de homólogos, con pequeñas diferencias de tamaño (L), (l), (l') y (l'').
- Grupo C) *Cromosomas con centrómero en posición subterminal.*
No son identificables en esta especie.
- Grupo D) *Cromosomas SAT.*
Un par de homólogos (i). El mayor de todo el complemento si se le suma el satélite.
- Grupo E) *Cromosomas con dos constricciones.*
No son identificables en esta especie.

Observamos que esta especie se distingue por la uniformidad de tipos morfológicos ya que, a excepción del par SAT, los cromosomas se reparten únicamente entre los de tipo A (metacéntricos) y tipo B (submetacéntricos), por tanto carecen de cromosomas con centrómero subterminal y de dos constricciones.

T. suffocatum L.

Especie perteneciente a la Sect. *Amoria* (Subsect. *Micranthemum*) de características taxonómicas y citológicas similares a la especie anterior, lo que pone de manifiesto su estrecho parentesco. Por estas circunstancias suponíamos que su número diploide fuese también $2n = 16$ y así lo indicó PRITCHARD (1969) y lo hemos confirmado nosotros al establecer su cariotipo, identificando los tipos cromosómicos que son iguales a los encontrados para *T. glomeratum*.

T. retusum L.

Perteneciente a la Sect. *Amoria* (Subsect. *Euamoria*). Esta especie se conocía anteriormente bajo la sinonimia de *T. parviflorum* y con esta denominación fue determinado su número cromosómico ($2n = 16$) por KARPECHENKO (1925).

Nosotros hemos observado que el número somático de *T. retusum* es $2n = 16$ y al mismo tiempo hemos establecido el cariotipo, que presenta características estructurales bastante semejantes a las de las dos especies anteriores, con ligeras modificaciones de estructura y distribución de los pares de homólogos. *T. retusum* posee solamente dos pares de cromosomas del grupo A (en lugar de tres) y cuatro pares del grupo B. En esta especie se identifica un par con centrómero subterminal; el par SAT se distingue de las otras especies por sus pequeñas dimensiones.

T. spumosum L.

Perteneciente a la Sect. *Mistyllus*, su número cromosómico $2n = 16$ fue indicado por PRITCHARD (1969) y confirmado por nosotros, habiendo establecido las características citológicas de su cariotipo que difiere, en parte, del correspondiente a especies de la Sect. *Amoria*. *T. spumosum* posee dos pares de cromosomas del grupo A; tres pares de homólogos del grupo B y en cambio hemos identificado dos pares del grupo C con centrómero subterminal que no se encuentran en las otras especies, siendo el par SAT el mayor del complemento diploide.

T. squarrosum subsp. **aequidentatum** (Pérez Lara) Malato-Beliz.

Esta importante especie estaba sin estudiar citológicamente y teníamos especial interés en determinar las características morfológicas de su cariotipo, porque en torno a la misma han surgido confusiones taxonómicas, ya que

según MALATO-BELIZ (1968), algunos autores la han tomado por *T. obscurum* Savi.

Hemos establecido su número cromosómico diploide, $2n = 16$, e identificado su cariotipo. La clasificación de los cromosomas pone de manifiesto las diferencias cariológicas que separan esta especie de las descritas anteriormente. Atendiendo a los tipos estructurales observamos que *T. squarrosus* posee dos pares del grupo A; dos del B; dos del C, y un par de dos constricciones.

Taxones y LTCd (*)	Par n.º	L. media	LTCd %	Propor. entre brazos L/C C/L	
<i>T. glomeratum</i> L. LTCd = 204,5	1 (SAT)	14,2	6,9	0,7	1,3
	2 (L)	13,7	6,6	1,6	0,6
	3 (V)	13,0	6,3	1,1	0,8
	4 (v)	13,0	6,3	1,0	0,9
	5 (l)	13,0	6,3	1,6	0,6
	6 (l')	12,7	6,2	1,3	0,7
	7 (l'')	11,5	5,6	1,5	0,6
	8 (v')	11,0	5,3	1,0	1,0
<i>T. suffocatum</i> L. LTCd = 174	1 (L)	11,7	6,7	1,2	0,7
	2 (V)	11,7	6,7	1,0	0,8
	3 (v)	11,5	6,6	1,1	0,9
	4 (l)	11,5	6,6	1,5	0,6
	5 (SAT)	11,2	6,4	0,8	1,1
	6 (l')	10,5	6,0	1,3	0,7
	7 (v')	9,5	5,4	1,1	0,8
	8 (l'')	9,2	5,2	1,2	0,7
<i>T. retusum</i> L. LTCd = 212,5	1 (V)	14,0	6,5	1,0	1,0
	2 (L)	13,7	6,4	1,3	0,6
	3 (l)	13,5	6,3	1,6	0,6
	4 (l')	13,5	6,3	1,4	0,6
	5 (SAT)	13,5	6,3	0,8	1,1
	6 (J)	13,2	6,2	2,1	0,4
	7 (v)	12,7	5,9	1,1	0,8
	8 (l'')	12,0	5,6	1,7	0,6
<i>T. spumosum</i> L. LTCd = 229	1 (SAT)	21,5	9,3	0,6	1,6
	2 (L)	15,2	6,6	1,6	0,6
	3 (l)	15,0	6,5	1,5	0,6
	4 (V)	14,0	6,1	1,0	0,9
	5 (l')	13,5	5,8	1,3	0,7
	6 (v)	13,0	5,6	1,1	0,8
	7 (J)	12,0	5,1	2,0	0,5
	8 (j)	9,5	4,1	2,0	0,4
<i>T. squarrosus</i> subsp. <i>aequidentatum</i> (Pérez Lara) Malato-Beliz LTCd = 235,5	1 (SAT)	18,2	7,7	0,8	1,0
	2 (2 const.)	17,7	1,2	7,5	0,7
	3 (L)	15,7	6,6	1,2	0,7
	4 (J)	14,5	6,1	2,0	0,4
	5 (V)	14,2	6,0	1,1	0,8
	6 (j)	13,5	5,7	2,8	0,3
	7 (v)	13,2	5,6	1,0	0,9
	8 (l)	10,5	4,4	1,3	0,7

CUADRO I.—Características del cariotipo de *T. glomeratum* L., *T. suffocatum* L., *T. retusum* L., *T. spumosum* L. y *T. squarrosus* subsp. *aequidentatum* (Pérez Lara) Malato-Beliz.

(*) LTCd = Longitud total del complemento diploide.

El estudio citológico de estas especies se ha complementado con la determinación de las medidas de los cromosomas, que han proporcionado datos muy valiosos para la identificación de sus características estructurales, como puede verse en el cuadro I.

La comparación de la longitud total del complemento diploide (LTCd) de las especies estudiadas muestra valores bastante similares para las pertenecientes a la Sect. *Amoria* (sobre todo *T. glomeratum*, *T. suffocatum* y *T. retusum*), confirmando el parentesco de estas especies más primitivas, las cuales, desde el punto de vista citológico, conservan el mismo número cromosómico $2n = 16$, que también se encuentra en las dos restantes, *T. spumosum* (Sect. *Mistyllus*) y *T. squarrosom* (Sect. *Eulagopus*). Estas últimas especies, incluidas en distintas secciones, muestran algunas diferencias citológicas. Las medidas correspondientes a la LTCd son mayores que en las especies de la Sect. *Amoria*.

Taxones	N.º crom.	Cromosomas SAT				
		Par núm.	Long. media	LTCd %	Prop. entre brazos L/C C/L	
<i>T. glomeratum</i> L.	2n=16	1	14,2	6,9	0,7	1,3
<i>T. suffocatum</i> L.	2n=16	5	11,2	6,4	0,8	1,1
<i>T. retusum</i> L.	2n=16	5	13,5	6,3	0,8	1,1
<i>T. spumosum</i> L.	2n=16	1	21,5	9,3	0,6	1,6
<i>T. squarrosom</i> subsp. <i>aequidentatum</i> (Pérez Lara) Malato-Beliz	2n=16	1	18,2	7,7	0,8	1,0

CUADRO II.—Comparación de los cromosomas SAT de los cinco taxones estudiados.

El cromosoma SAT, presente en todas las especies estudiadas, es el de mayor longitud de todo el complemento diploide en *T. glomeratum*, *T. spumosum* y *T. squarrosom*, siendo más pequeño en *T. retusum* y *T. suffocatum*, donde dicho cromosoma presenta valores de tipo medio (Cuadro II).

Si consideramos los restantes grupos cromosómicos que componen el cariotipo de las especies, por ejemplo el A y el B, observamos, como era de esperar, que entre *T. glomeratum* y *T. suffocatum*, ambos de la Sect. *Amoria*, existe total analogía en cuanto a la distribución de tipos estructurales; poseen tres pares de cromosomas del grupo A y cuatro pares de cromosomas del grupo B. En *T. retusum* esta proporción varía ligeramente, ya que sólo posee dos pares del grupo A, cuatro del grupo B y uno del grupo C, diferencias que se hacen más marcadas en *T. spumosum* con dos pares del grupo A, tres

del grupo B y dos del grupo C, mientras que *T. squarrosus* presenta dos pares del grupo A, dos del grupo B y dos del grupo C. Por tanto, los cromosomas subterminales del grupo C están representados solamente en *T. retusum* con un solo par y en *T. spumosum* y *T. squarrosus* donde existen dos pares, siendo esta última especie la única que posee cromosomas del grupo E de dos constricciones (Cuadro III).

Grupos	Especies 2n = 16				
	<i>T. glomeratum</i> (Sect. <i>Amoria</i>)	<i>T. suffocatum</i> (Sect. <i>Amoria</i>)	<i>T. retusum</i> (Sect. <i>Amoria</i>)	<i>T. spumosum</i> (Sect. <i>Misryllus</i>)	<i>T. squarrosus</i> subsp. <i>aequidentatum</i> (Sect. <i>Eulagopus</i>)
A. (centróm. pos. med.)	3 pares	3 pares	2 pares	2 pares	2 pares
B. (centróm. pos. subm.)	4 »	4 »	4 »	3 »	2 »
C. (centróm. pos. subm.)	—	—	1 par	2 »	2 »
D. (cromos. SAT)	1 par	1 par	1 »	1 par	1 par
E. (cromos. con 2 const.)	—	—	—	—	1 »
LTCd	204,5	174,0	212,5	229,0	235,5

CUADRO III.—Tipos cromosómicos de los cinco taxones de *Trifolium* estudiados.

DISCUSION

En nuestros trabajos sobre *Trifolium* hemos conseguido establecer el cariotipo de varias especies, no determinado anteriormente, mediante análisis de las características numéricas y estructurales de los cromosomas. La información citológica obtenida puede suministrar algunos elementos para el estudio de las tendencias evolutivas del género.

Según Hegi (1935), la sección más primitiva del género *Trifolium* es *Amoria*, en la cual está comprendida la Subsect. *Falcatula*, donde se observan los caracteres más primitivos desde el punto de vista morfológico, puesto que las especies presentan brácteas florales y legumbres polispérmicas. Su número básico es 8, el cual se encuentra también en otra sección primitiva, *Lupinaster*, que posee además algunas especies poliploides.

En el resto de las secciones del género *Trifolium* los números básicos son 8 y, como excepción, 7 en *Chronosemium*.

Asimismo parece que en las especies anuales autógamas del género *Trifolium* existen tendencias hacia la reducción del número cromosómico y, por el contrario, en las especies perennes alógamas se marca una dirección hacia casos de poliploidía.

Los datos citológicos apoyan la hipótesis de que las tendencias evolutivas del género *Trifolium* van en sentido de una reducción del número cromosómico en las especies mediterráneas anuales más avanzadas, cuyo ejemplo más representativo lo constituyen las encuadradas en la subsección *Probatostoma*, estudiadas anteriormente por nosotros (ANGULO & al., 1969, 1970), donde figuran los números cromosómicos más bajos de todo el género y se incluyen las tres especies de *Trifolium* de diez cromosomas encontradas hasta ahora. En cambio, las consideradas más «primitivas», pertenecientes a la Sect. *Amoria*, presentan números diploides más elevados, $2n = 16$, que al mismo tiempo son los más comunes en *Trifolium*. Este hecho lo hemos podido comprobar, una vez más, en el estudio citológico de las tres especies pertenecientes a la Sect. *Amoria* (*T. glomeratum*, *T. suffocatum* y *T. retusum*), las cuales presentan un número somático $2n = 16$ y cromosomas de análogas características estructurales que dan origen a cariotipos más uniformes típicos de las especies primitivas.

BIBLIOGRAFIA

- ANGULO, M.^a D., A. M.^a SÁNCHEZ RIVERA & F. GONZÁLEZ-BERNÁLDEZ (1969) Estudios cromosómicos en el género *Trifolium*, II. *Anal. Est. Exper. Aula Dei* 9 (2-4): 97-110.
- (1970) Estudios cromosómicos en el género *Trifolium*, III. *Bol. Soc. Brot.*, ser. 2 44: 13-26.
- BEMPONG, M. & K. SINK (1968) The Karyotype of *Poinsettia*. *Journ. Hered.* 59: 259-261.
- CHEN, CH. & P. B. GIBSON (1971) Karyotypes of Fifteen *Trifolium* species in Section *Amoria*. *Crop. Sci.* 11: 441-445.
- COOMBE, D. E. (1968) *Trifolium*, in TUTIN, T. G. & al. (eds.) *Flora Europaea* 2: 157-172. Cambridge.
- HEGI, G. (1935) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. München.
- ISING, G. (1967) Chromosome breakage and aneuploidy in *Cyrtanthus*. *Hereditas* 57: 312-318.
- KARPECHENKO, G. D. (1925) Karyologische Studien über die Gattung *Trifolium*. *Bull. Appl. Bot. Pl.-Breed.* 14: 271-279.
- LEVAN, A., K. FREDGA & A. A. SANDBERG (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

- MALATO-BELIZ, J. (1968) Um novo trevo para a flora portuguesa. *Portugal. Acta Biol. (B)* 9: 309-318.
- PRITCHARD, A. J. (1969) Chromosome numbers in some species of *Trifolium*. *Aus. Jour. Agric. Res.* 20: 883-7.
- ROTHFELS, K. H. & L. SMINOVITCH (1958) The chromosome complement of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) determined in kidney cells cultivated in vitro. *Chromosoma (Berlin)* 9: 163-175.
- TJIO, J. H. & A. LEVAN (1950) The use of oxiquinoline in chromosome analysis. With an appendix by STALFELT, M. G.—«The effect of oxyquinoline on protoplasmic viscosity». *Anal. Est. Exper. Aula Dei* 2: 21-64.
- VICIOSO, C. (1953) Tréboles españoles. Revisión del género *Trifolium*. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* 11 (2): 289-383.

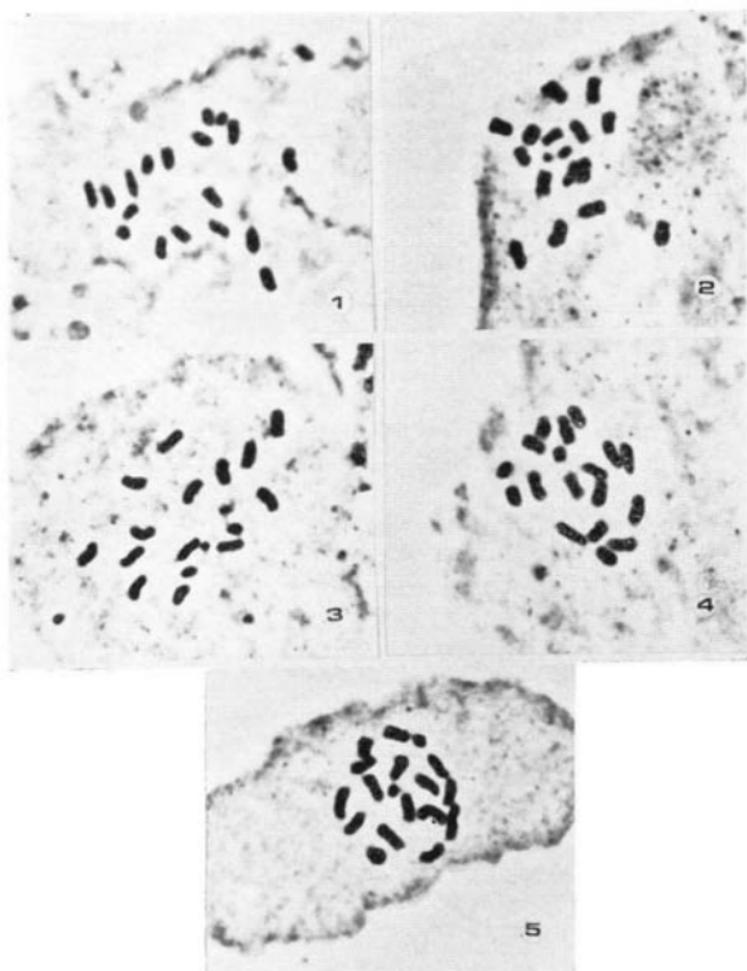


LÁMINA I.—Placas metafásicas de los taxones diploides con $2n = 16$ estudiados. Fig. 1, *T. glomeratum* L. — Fig. 2, *T. suffocatum* L. — Fig. 3, *T. retusum* L. — Fig. 4, *T. spumosum* L. — Fig. 5, *T. squarrosus* subsp. *aequidentatum* (Pérez Lara) Malato-Beliz. (Metafasas $\times 3.328$).

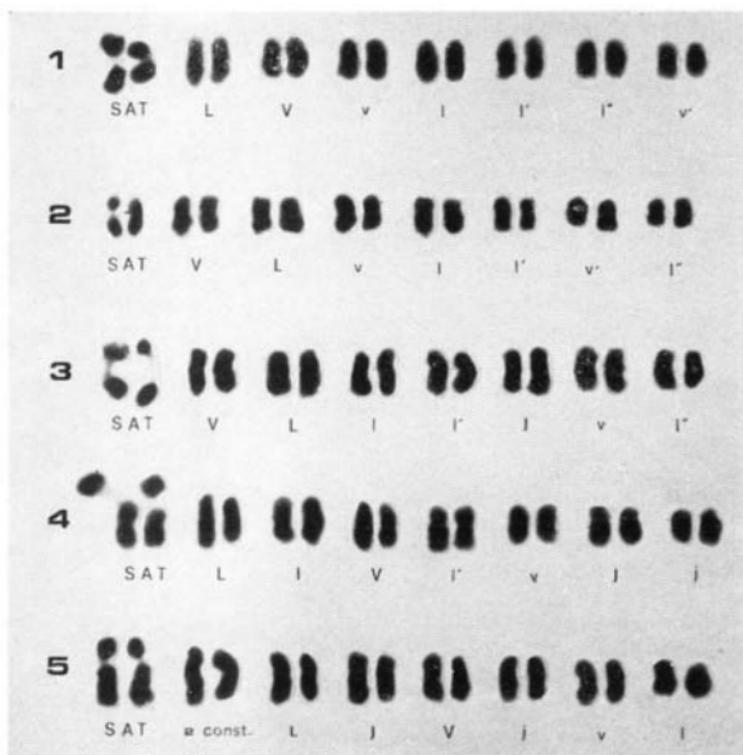


LÁMINA II.—Cariotipos de los taxones estudiados, basados en las placas metafásicas de la lám. I, Fig. 1, *T. glomeratum* L. — Fig. 2, *T. suffocatum* L. — Fig. 3, *T. retusum* L. — Fig. 4, *T. spumosum* L. — Fig. 5, *T. squarrosum* subsp. *aequidentatum* (Pérez Lara) Malato-Beliz. (Metáfases x 6.144).