

Estudio taxonómico de tres especies de *Cupressus* *

L. S. RODRIGUEZ J.
Laboratorio de Fanerógamas
Departamento de Botánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.
México, D. F.

A. HERNANDEZ C.
Laboratorio de Genética
Departamento de Zoología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.
México, D. F.

RODRÍGUEZ, L. S. y A. HERNÁNDEZ, 1980. Estudio Taxonómico de tres especies de *Cupressus*.
An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx. 23: 53-83.

RESUMEN: Se estudiaron los cromosomas somáticos de *Cupressus lusitanica* en meristemas radicales obtenidos a partir de semillas procedentes de Portugal. De *C. benthamii* y Veracruz y de *C. lindleyi* los mismos materiales en localidades de los estados de Guerrero, Hidalgo, México y Michoacán. De las dos últimas especies se estudiaron los cromosomas somáticos y gaméticos. Todas las observaciones citológicas, incluyendo la del patrón de bandeado, se hicieron mediante la técnica del aplastamiento ("squash") en carmin acético, previa fijación en mezcla de Farmer.

Se señala el número cromosómico somático $2n = 22$ en las dos especies mexicanas *Cupressus benthamii* y *C. lindleyi*, y se confirma ese número en *C. lusitanica*, que ya había sido dado a conocer por otros autores; se determinan los cariotipos de las tres especies, y se señalan notables diferencias en comparación con lo propuesto por otros autores para *C. lusitanica*.

Se describe por primera vez el patrón de bandeado cromosómico en las tres especies, en un esfuerzo por ofrecer datos más precisos de la morfología de los cromosomas, lo que se espera sea de utilidad en el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre esas especies.

Por primera vez se indica que el número cromosómico gamético es $n = 11$ para las dos especies mexicanas mencionadas, cuyo estudio meiótico pormenorizado reveló la ocurrencia de numerosas anomalías de comportamiento, como retraso o indiferencia de uno o más pares, y de anomalías estructurales, como inversiones paracéntricas heterocigóticas y translocaciones recíprocas que resultaron en la formación de puentes cromosómicos en las anafases.

De los resultados obtenidos en la comparación de los cariotipos, tomando en cuenta todos los parámetros básicos, así como también el número y distribución de bandas heterocromáticas y el porcentaje de eucromatina por par de cromosomas y total por dotación, se con-

* Este trabajo, en forma de tesis profesional, fue presentado por L. S. Rodríguez J. como requisito parcial para optar al título de Biólogo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

cluye que las tres especies estudiadas son, desde el punto de vista citológico, entidades diferentes, siendo posiblemente la más primitiva *C. lusitanica* y la más evolucionada *C. benthamii*, ocupando *C. lindleyi* una posición intermedia. De ninguna manera se pretende haber resuelto en definitiva la posición taxonómica tan debatida en que se encuentran dichas especies, ni tampoco haber esclarecido sus relaciones filogenéticas hasta un punto fuera de toda discusión; solamente se propone que de acuerdo con la teoría de la evolución por duplicación génica, sostenida entre otros autores, por Ohno y Stebbins, los datos encontrados apuntan hacia las conclusiones señaladas anteriormente.

INTRODUCCIÓN

Las consideraciones filogenéticas que se introdujeron en la taxonomía, así como las evidencias que se aducen para explicar semejanzas entre organismos actuales, se interpretan como la consecuencia de complejos fenómenos genéticos que han operado a lo largo del tiempo. Este nuevo conocimiento de la naturaleza dinámica de las especies ha favorecido sin lugar a dudas el desarrollo de la taxonomía y la influencia del llamado período sistemático-citogenético, que comenzó en la segunda década de este siglo y continúa dominando la situación. Así, se aplican con éxito a la taxonomía los rápidos avances de la citología y la genética, y los datos cromosómicos, especialmente el estudio y comparación de cariotipos, el conocimiento de series poliploides y la información derivada de cruzamientos e hibridación, se suman a los métodos taxonómicos tradicionales (Heywood, 1968).

Lo anterior justifica sobradamente el interés que se ponga en todo intento de esclarecer posiciones taxonómicas confusas por medio de datos citogenéticos en aquellos casos en que la taxonomía tradicional no haya rendido resultados satisfactorios.

Las relaciones entre las especies *Cupressus benthamii* Endl., *C. lindleyi* Klotzsch, y *C. lusitanica* Mill., las dos primeras mexicanas y la tercera descrita de Portugal, han sido confusas desde las primeras descripciones y todavía se prestan a controversias.

A lo largo de más de cien años, muchos autores han expuesto diversas opiniones acerca de estas especies. Así por ejemplo, Carriere, en 1867, menciona como especie a *C. lusitanica* y considera a *C. lusitanica* var. *benthamii* y *C. lusitanica* var. *lindleyi*; pero en 1895, Masters considera a *C. lusitanica* y *C. benthamii* como dos especies diferentes y a esta última le asigna *C. benthamii* var. *lindleyi*. Posteriormente, Camus en 1914, en su gran obra *Les Cyprès*, considera que *C. lindleyi* es sinónimo de *C. lusitanica* y asigna a ésta *C. lusitanica* var. *benthamii*.

En 1947, Martínez, al revisar el material de *C. lusitanica* procedente de Portugal y compararlo con el material de México, no encuentra ninguna relación y considera a *C. lindleyi* y *C. benthamii* como especies bien definidas. En la mencionada contribución Martínez cita entre los antecedentes el trabajo de Franco de 1945, quien afirma que "*C. lusitanica* es una especie originaria de México, y en vista de la estrecha afinidad que tiene con *C. benthamii* hace un nuevo arreglo sistemático en el que *C. benthamii* queda como subespecie de *C. lusitanica* y también subordina a *C. lindleyi*" sin embargo, en un trabajo posterior

de 1949, el mismo Franco considera que "*C. lindleyi* es una especie próxima a *C. lusitanica* y acepta considerarla como una forma espontánea de ésta".

Wolf (in Wolf y Wagner, 1948) trata a las especies en cuestión como una sola entidad que denomina *C. lusitanica*, aunque reconoce que su arreglo taxonómico no es satisfactorio, pues considera que faltan estudios más extensos al respecto.

No sólo existen controversias entre diferentes autores, sino que también se dan casos en que un mismo autor expone, en diferentes trabajos, distintas opiniones acerca del mismo material, lo que aumenta la confusión; así están, por ejemplo, el caso de Franco, citado anteriormente, y el de Standley, quien en tres trabajos distintos, de 1920, 1950 y 1958, adopta diferentes puntos de vista; en el primero menciona la especie *C. benthamii* y le asigna como sinónimo a *C. lindleyi*, pero en el capítulo de adiciones y correcciones agrega: "Parece necesario adoptar el engañoso nombre de Miller" (*C. lusitanica*) "para la especie mexicana" (*C. benthamii*); en el segundo trabajo, acepta para Guatemala la especie *C. lindleyi* y descarta a *C. lusitanica*, basándose en el criterio de Martínez (op. cit.); y en el tercer trabajo trata a las plantas de México y Guatemala como *C. lusitanica* por ser el nombre que tiene prioridad y no acepta las diferencias de Martínez por considerar que hay "solapamiento de caracteres".

Tomando en cuenta la confusa situación taxonómica de las especies mencionadas, en este trabajo se pretende contribuir a su esclarecimiento, aportando datos citogenéticos que pudieran servir para establecer relaciones entre las citadas especies de *Cupressus*.

Fueron Numata y Yamashita, en 1936, (citados por Kanezawa, 1949, citado por Hunziker, 1961) los primeros en establecer que el número somático de cromosomas en *C. lusitanica* var. *benthamii* era de $2n = 22$. Diez años más tarde Camara y De Jesús (1946) estudiaron nuevamente *C. lusitanica* encontrando el mismo número somático y estableciendo que el número gamético es de $n = 11$. A estos dos trabajos siguieron otros también de índole citológica, como los de Mehra y Khoshoo (1948), quienes estudiaron las especies *C. funebris*, *C. sempervirens* y *C. torulosa*, y después (1956) *C. cashmeriana*, *C. lusitanica* var. *benthamii* y nuevamente *C. sempervirens* y *C. torulosa*. Hunziker realizó un trabajo en 1958 que incluye siete especies de *Cupressus*: *C. arizonica*, *C. funebris*, *C. glabra*, *C. lusitanica* var. *benthamii*, *C. lusitanica* var. *lusitanica*, *C. macrocarpa*, *C. sempervirens* y *C. torulosa*. Por último, Thomas y Goggans (1972), llevaron a cabo un estudio de once taxa de *Cupressus*: *C. arizonica* var. *arizonica*, *C. arizonica* var. *glabra*, *C. arizonica* var. *stephensonii*, *C. arizonica* var. *nevadensis*, *C. guadalupensis*, *C. sargentii*, *C. macrocarpa*, *C. goveniana* var. *goveniana*, *C. goveniana* var. *pygmaea*, *C. bakeri* y *C. macnabiana*. En los últimos cuatro trabajos, los autores consignan para las especies mencionadas, el número $2n = 22$, y Hunziker menciona además el hallazgo de cuatro diferentes cariotipos en *C. lusitanica* y dice que tal hecho confirma lo encontrado por Camara y De Jesús, pero conviene aclarar que los autores portugueses, sólo mencionan variabilidad cariotípica sin precisar cuántas clases encontraron.

El estudio de números cromosómicos en otros géneros de la familia Cupresaceae ha mostrado que el número haploide es en general de 11 y el número

diploide de 22 (Sax y Sax, 1953), observándose muy poca variabilidad en el número cromosómico de los géneros de esta familia. Aunque este hecho podría limitar el valor de estudios citotaxonómicos para la definición de especies de un determinado género, como en el caso presente, no debe juzgarse "a priori" dicha situación para ningún taxón, ya que en la actualidad se cuenta con técnicas cada vez más finas que permiten estudios cromosómicos más completos, y tomando en cuenta la experiencia de grupos que se consideraban de gran estabilidad cariotípica, en un momento dado un nuevo estudio cariológico puede invalidar hechos admitidos como ciertos, con lo que habrá de revalorar los estudios taxonómicos, como es el caso de *Podocarpus* (Hair, 1963, citado por Moore, 1968).

Este estudio se proyectó con los siguientes objetivos: primero, estudiar los cariotipos de las tres especies para compararlos y poder establecer así las semejanzas y diferencias de la morfología cromosómica que tradicionalmente se toman en cuenta en las comparaciones cariotípicas. Para refinar un poco más los datos que habrían de compararse, se decidió llegar hasta el establecimiento del patrón de bandeo de los cromosomas somáticos de cada especie. En segundo lugar, llevar a cabo un estudio de la morfología y el comportamiento de los cromosomas meióticos en las dos especies mexicanas y compararlos entre sí. Por último ponderar los resultados obtenidos para juzgar si contribuyen a definir la posición taxonómica de las especies en cuestión y sus relaciones filogenéticas.

Los autores hacen presente su sincero agradecimiento al Dr. Jerzy Rzedowski por su asesoría a lo largo de todo el trabajo y a los señores ingenieros Antonio N. Téllez y J. Malato Beliz, quienes enviaron material procedente de Portugal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon semillas e inflorescencias masculinas colectadas en las siguientes localidades:

ESPECIE	PAIS	ESTADO	MUNICIPIO
<i>C. benthamii</i>	México	Hidalgo Veracruz	Tenango de Doria Agua Blanca de Iturbide Xico
<i>C. lindleyi</i>	México	Michoacán México Hidalgo Guerrero	Tzitzio Anganguero Texcoco El Oro Zempcalá Acaxochitlán Chilpancingo
<i>C. lusitanica</i>	Portugal	Bussaco Elvas	

El estudio mitótico se llevó a cabo en radículas de semillas puestas a germinar en condiciones de laboratorio, que se fijaron durante 3 a 24 horas en líqui-

do de Farmer. Antes de proceder a la tinción de los cromosomas, y con el objeto de obtener una buena separación de células meristemáticas, el material se ablandó en la mezcla disociante propuesta por Hernández Corzo (1954).

Para la tinción de cromosomas se aplicó la técnica del "squash" o aplastamiento en carmín acético modificada por Belling (1926), descrita por Burnham (1951).

Para la observación de cromosomas meióticos se utilizaron inflorescencias masculinas jóvenes que se colectaron y se fijaron en líquido de Farmer en el mismo sitio de colecta, en los lugares ya citados para *C. benthamii* y *C. lindleyi*. De *C. lusitanica* ("sensu stricto"), no fue posible conseguir material fresco para la búsqueda de figuras meióticas, y para la observación de cromosomas se siguió la misma técnica que para cromosomas mitóticos.

Todos los ejemplares de los que se tomaron muestras para el estudio citológico están depositados en el Herbario Fanerogámico del Departamento de Botánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, así como las preparaciones de dicho estudio quedaron depositadas en el Laboratorio de Genética del Departamento de Zoología de la misma Escuela.

DESCRIPCIÓN DE LA MITOSIS

Con el objeto de establecer el número y la morfología de los cromosomas, se estudió en las tres especies el ciclo mitótico en tejidos meristemáticos primarios del ápice de la radícula. Se obtuvieron abundantes profases avanzadas y metafases, lo que permitió establecer con toda precisión que en las tres especies el número somático normal es de $2n = 22$.

La claridad de las figuras permitió también estudiar con ciertos pormenores la morfología de cada uno de los cromosomas de las tres dotaciones, con lo que pudieron configurarse los cariotipos correspondientes a cada especie. Los idiogramas correspondientes, contruidos sobre los datos promedio de diez figuras se dan en las figuras 1, 2 y 3, y su presentación comparada en la figura No. 4. El valor de la variabilidad observada en longitud total entre los distintos pares, para mencionar sólomente los extremos mínimo y máximo de heteromorfismo en ese parámetro, fue en *C. lusitanica*, de 2% en los pares 1, 4, 5 y 8 y de 10% en el 7; en *C. lindleyi*, de 3% en los pares 7, 8 y 11 y de 10% en los pares 2 y 5; y en *C. benthamii* de cero % en los pares 7 y 8 y de 10% en los pares 3 y 9.

Del estudio citológico de numerosas especies vegetales se sabe que la mitosis es un fenómeno sincrónico, por lo menos en ciertos tejidos, entre otros los meristemáticos primarios, y que ha sido posible establecer, para algunos tejidos dentro de límites estrechos de variabilidad, la duración del ciclo mitótico completo y la de cada una de sus fases, así como señalar con cierta seguridad el horario en que es más factible hallar las figuras de mitosis más convenientes para el análisis cromosómico. No obstante lo anterior, no fue posible establecer este horario en ninguna de las especies estudiadas, ya que se hallaron células en división a muy diversas horas del día, o sea que las mitosis parecían ocurrir a lo largo del día de manera irregular y siempre en unas cuantas células del ápice de la radícula.

Los hechos más destacados, observados en lo que ha dado en llamarse "conducta cromosómica" en el proceso mitótico fueron los siguientes: 1) con poca frecuencia se hallaron células en las que los polos del huso divisorio estaban orientados en sentido transversal o perpendicular al eje longitudinal de la célula y, en consecuencia, los cromosomas guardaban una posición fuera de lo común; 2) pese a lo numeroso de las radículas estudiadas, casi no se hallaron metafases típicas, es decir, con los cromosomas espiralizados al máximo y con las cromátidas separadas, como es lo usual en esta fase, por lo que las profases avanzadas resultaron más útiles en la determinación de la estructura cromosómica gruesa; 3) tanto en las células interfásicas como en aquellas en profase incipiente, se observaron con claridad dos nucléolos, uno más grande que el otro, y con menos frecuencia un solo gran nucléolo en las células intercinéticas; 4) en la profase se notó cierta tendencia a la sinapsis somática, aunque no muy íntima ni generalizada; 5) en la anafase se observó, con más frecuencia de lo usual, indiferencia, adelanto o retraso de algunos cromosomas, sin que esto resultara, aparentemente, en pérdida posterior para alguno de los grupos resultantes.

Los cariotipos cuyos idiogramas se presentan en las figuras 1, 2 y 5 se arreglaron numerando los pares de homólogos del 1 al 11, en orden decreciente de longitud total en unidades relativas, que aquí se abrevian u. r.; éstas se obtienen sumando la longitud en micras de los cromosomas de una dotación haploide y haciendo equivaler el total a 1000 unidades relativas; después se calcula cuántas de éstas corresponden a cada cromosoma, con lo que se evitan las discrepancias que necesariamente surgen cuando se comparan cromosomas dentro de la misma fase, ya que un mismo cromosoma aparecerá más largo al principio de aquélla, cuando no ha alcanzado su máxima contracción, que hacia la mitad o al final de la fase. En el arreglo cariotípico se tomó en cuenta también la posición relativa del centrómero, nombrándoseles de acuerdo con este parámetro, metacéntricos (M), submetacéntricos (SM) o acrocéntricos (A), según que el centrómero estuviera, respectivamente, en el centro o casi en el centro del cromosoma, un poco desplazado hacia un extremo o marcadamente hacia un extremo. También se determinó el índice centromérico, que indica el porcentaje de la longitud total que representa el brazo corto y que se expresa en fracción decimal. Estos tres parámetros se dan en forma comparada para las tres especies de que se trata en el Cuadro No. 1, en donde se señala también, en algunos cromosomas, la presencia de un gran satélite separado del brazo corto por una amplia constricción secundaria en forma de filamento, que es muy probable que sea la región organizadora del nucléolo.

En resumen, la elaboración de los cariotipos de *Cupressus* se hizo con apego a las normas propuestas en la llamada Conferencia de Denver, de 1960, con el fin de uniformar la clasificación y nomenclatura de los cromosomas humanos y su presentación cariotípica, lineamientos que han tenido aceptación general después de las pequeñas modificaciones introducidas en las Conferencias de Londres (1964), de Chicago (1968) y de París (1971). Este sistema de clasificación y nomenclatura se ha ido haciendo extensivo paulatinamente a otros organismos animales, y a vegetales superiores.

CUADRO No. 1

PAR CROMO- SOMICO	CUPRESSUS BENTHAMII			CUPRESSUS LINDLEYI			CUPRESSUS LUSITANICA		
	longitud total en u. r.	índice centro- mérico	posición rel. del centrómero	longitud total en u. r.	índice centro- mérico	posición rel. del centrómero	longitud total en u. r.	índice centro- mérico	posición rel. del centrómero
1	170	0.24	SM	141	0.12	A + sat	163	0.34	SM
2	122	0.12	A + sat	130	0.48	M	130	0.16	A + sat
3	108	0.40	SM	123	0.36	SM	125	0.44	M
4	92	0.47	M	120	0.45	M	97	0.46	M
5	88	0.40	SM	95	0.37	SM	94	0.27	SM
6	88	0.40	SM	81	0.40	SM	84	0.39	SM
7	84	0.45	M	74	0.31	SM	84	0.45	M
8	82	0.48	M	70	0.47	M	76	0.40	SM
9	74	0.45	M	63	0.44	M	61	0.36	SM
10	44	0.45	M	53	0.47	M	56	0.32	SM
11	40	0.40	SM	49	0.38	SM	28	0.32	SM

Cromosomas somáticos de *Cupressus benthamii*.

En la dotación somática de esta especie se observa que el par 1 SM, es con mucho el de mayor longitud (170 u. r.); el par 2, el único A de toda la dotación, de 122 u. r., posee un gran satélite de 22 u. r., separado del brazo corto por una constricción secundaria en forma de filamento tenue de 21 u. r., cuando está en máxima extensión. Los restantes nueve pares podrían separarse por sus longitudes relativas en dos grupos: uno, de medianos a pequeños, los pares del 3 al 9, de 108, 92, 88, 88, 84, 82 y 74 u. r., respectivamente; y el otro grupo, de los más pequeños, los pares 10 y 11 de 44 y 40 u. r., respectivamente. Hay en total 5 M, 5 SM y 1 A.

El patrón de bandeado de los cromosomas de esta especie que se observa en el idiograma de la figura 1 se describe en todos sus parámetros sobre la base de los mismos promedios que se utilizaron en la presentación cariotípica; se señala en negro a todo el material heterocromático, sin distinción de intensidades ópticas, pero que en las preparaciones se observó desde oscuro a muy oscuro y en blanco al material eucromático, igualmente sin distinción de intensidades, pero que en las preparaciones se vio desde claro hasta muy claro. De esta manera, el bandeado de los cromosomas somáticos de *Cupressus benthamii* puede describirse así:

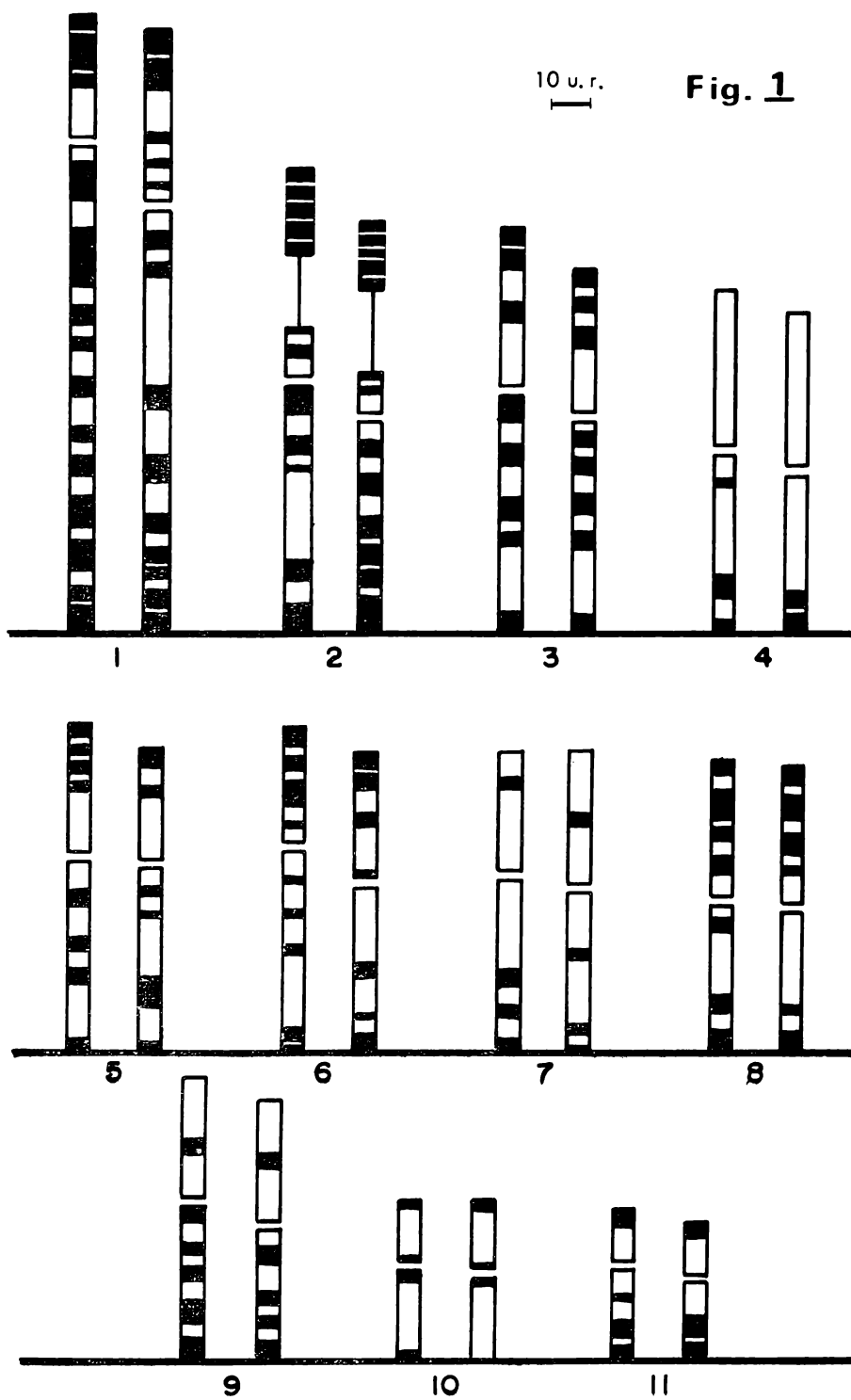
En los brazos cortos del par 1 hay de 3 a 5 bandas oscuras de diferente anchura alternando con 3 a 5 bandas claras; las bandas oscuras representan en conjunto la mitad aproximadamente de la longitud total de los brazos cortos; en los brazos largos hay de 9 a 11 bandas oscuras de diferente anchura y posición relativa, que en total suman de 40 a 60 por ciento de longitud de esos brazos; en los extremos distales de ambos brazos hay telómeros prominentes.

En el par 2, los satélites están formados de manera muy semejante por 5 bandas oscuras separadas por muy finas bandas claras; la heterocromatina representa 95 por ciento de la longitud de los satélites; en los brazos cortos hay dos bandas oscuras y dos claras de casi idéntica posición y anchura, pero en los brazos largos hay marcadas diferencias, no tanto en el número de bandas cuanto en la distribución y porcentaje que representan, que es de 30 a 50 por ciento; en los extremos distales de los brazos largos hay telómeros prominentes, en tanto que los de los brazos cortos son finos.

En los homólogos del par 3 son muy semejantes el número, la anchura y la distribución de las bandas oscuras en ambos brazos; la heterocromatina representa 36 por ciento de la longitud total de los cromosomas y está equitativamente distribuida en los dos brazos; en los extremos distales de los dos largos hay telómeros, pero no en los extremos proximales de los brazos cortos. Este es uno de los pares en que los componentes se mostraron más uniformes.

También en el par 4 los componentes son muy semejantes entre sí, sobre todo porque los brazos cortos de ambos carecen de heterocromatina; en los brazos largos hay de 2 a 3 bandas oscuras, que representan 25 por ciento de la longitud, de manera que éste es el par más eucromático, ya que la heterocromatina forma apenas 12% del total de los cromosomas.

En el par 5 hay de 2 a 4 bandas oscuras en los brazos cortos, que represen-



tan de 50 a 45% de la longitud total de éstos. Los brazos largos son muy semejantes entre sí, tanto en el número de bandas heterocromáticas, como en su longitud y en el porcentaje que representan, que es alrededor de 50, aunque la distribución de las bandas en uno y otro es un tanto desigual; en los extremos distales de los brazos cortos y largos hay telómeros conspicuos, pero no en los extremos proximales.

El par 6 es bastante heteromórfico, con 4 bandas oscuras de diferente anchura y ubicación en los brazos cortos, y de 3 a 5 en los brazos largos, también de anchura y ubicación desiguales; alrededor de la mitad de los brazos cortos está formada por heterocromatina, en tanto que en los brazos largos ese material sólo representa 30%; en ambos brazos hay telómeros distales prominentes, pero no en las regiones próximas al centrómero.

El par 7 es otro caso de notable semejanza entre sus componentes; hay una banda oscura en los brazos cortos y 3 en los largos, y el porcentaje que representan es de 10 a 12 en los primeros y de 20 a 25 en los segundos, aunque la posición relativa de las bandas no es muy coincidente; sólo hay telómeros en los extremos distales de los brazos largos. Este par es también muy eucromático, ya que la heterocromatina sólo representa 20% de los cromosomas.

El par 8 es uno de los más homogéneos en cuanto a parámetros básicos (longitud total, relación entre brazos, posición relativa del centrómero, etc.) en los brazos cortos hay 4 bandas heterocromáticas de casi exactamente la misma ubicación y anchura, que representan alrededor del 50% de aquellos; pero los brazos largos difieren entre sí, con 2 a 3 bandas oscuras no equiparables, que equivalen más o menos a un tercio de su longitud; sólo en los extremos distales de ambos brazos hay telómeros.

En el par 9 los brazos cortos son idénticos en todos los parámetros básicos y llevan una sola banda heterocromática de la misma anchura y en posición media, que representa 15% de esos brazos; no hay telómeros; los brazos largos difieren entre sí con 4 a 5 bandas oscuras de distinta ubicación y anchura, con porcentaje de heterocromatina que rebasa un poco la mitad de la longitud total de esos brazos, que muestran telómeros prominentes distales.

Los homólogos del par 10 son también bastante uniformes: los brazos cortos tienen dos bandas oscuras de la misma anchura y en posición de telómeros distales y proximales; los brazos largos, muy eucromáticos, llevan de una a 2 bandas oscuras, con equivalencia de 15 a 25% de la longitud de esos brazos; hay telómeros proximales y probablemente también distales, aunque en muchas figuras pareció faltar el telómero distal de uno de los homólogos.

En el par 11 los brazos cortos son semejantes entre sí, cada uno con una sola banda heterocromática en posición de telómero distal, que equivale a un tercio, aproximadamente, de la longitud de esos brazos; en los brazos largos hay de 2 a 3 bandas oscuras que se aproximan a 50%; hay telómeros distales pero no proximales.

Cromosomas somáticos de *Cupressus lindleyi*.

En la dotación somática de *C. lindleyi* hay también 5 pares de M, 5 de SM y uno de A; pero aquí el par 1 es el A, de 141 u. r., con satélite de 42 u. r.,

es decir, proporcionalmente de bastante más del doble que el satélite de la especie anterior (que lo lleva en el par 2), separado del brazo corto por un pedicelo o constricción secundaria de apenas 10 u. r., en máxima extensión. Los 5 pares de M son los números 2, 4, 8, 9 y 10 de 130, 120, 70, 63 y 53 u. r. respectivamente; los 5 pares de SM, los números 3, 5, 6, y 11, miden 123, 95, 81, 74 y 49 u. r., respectivamente. El patrón de bandeo cromosómico en *Cupressus lindleyi*, que aparece en la figura 2, se describe a continuación sobre las mismas bases que se utilizan en las tres especies.

El par 1, que en esta especie es el portador de los grandes satélites, es fuertemente heterocromático. Los satélites tienen en ambos miembros del par la misma longitud relativa (30% de la longitud cromosómica total) y muestran de 3 a 5 bandas oscuras de diferente anchura y ubicación, con equivalencia porcentual de 70 a 95 de la longitud de esta estructura marcadora; los brazos cortos, muy dispares en longitud relativa, llevan dos bandas heterocromáticas de anchura semejante, pero de ubicación distinta, formando el telómero proximal la que aparece en posición inferior en el idiograma; los brazos largos llevan de 4 a 6 bandas oscuras, con equivalencia porcentual de 55 a 60; en los extremos distales de estos brazos hay telómeros extensos, pero los proximales son reducidos.

En el par 2 los brazos cortos son casi enteramente eucromáticos, salvo el telómero distal que sólo se observó en uno de los homólogos, como si tuviera siempre en condición heterocigótica; en cambio los brazos largos son muy heterocromáticos, con 3 a 5 bandas oscuras muy anchas, que representan de 50 a 80% de la longitud de esos brazos; ambos llevan telómeros distales muy prominentes.

En el par 3 los brazos cortos llevan de 4 a 5 bandas oscuras que abarcan de 70 a 90% de su longitud, de manera que son tan heterocromáticos o más aún que los propios satélites del par 1; en cambio, los brazos largos, que son muy semejantes en estructura, llevan 2 bandas oscuras, una terminal telomérica y otra hacia el medio, que suman alrededor de 30% de la longitud de esos brazos.

El par 4 es el menos heterocromático de la dotación, con bastante semejanza entre los homólogos; los brazos cortos llevan 2 bandas oscuras en forma de dos telómeros distales y dos próximas al centrómero; los brazos largos tienen de dos a 4 bandas y siempre muestran telómeros distales y proximales. La heterocromatina representa 25% de la longitud cromosómica total.

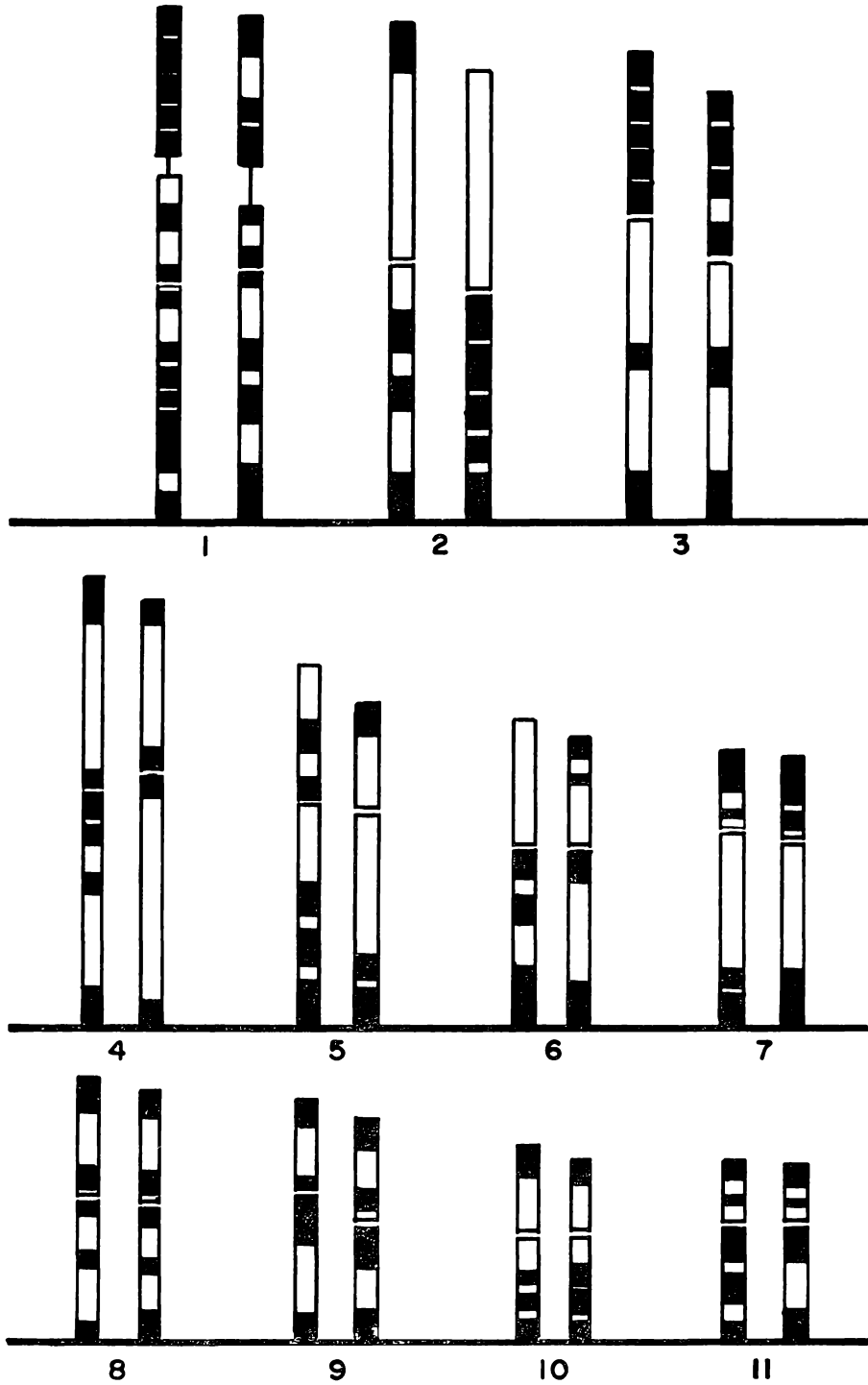
El par 5 es marcadamente heteromórfico, tanto en el número de bandas oscuras en ambos brazos como en el porcentaje que representan, así como en la variabilidad que se observó en la presencia de telómeros, ya que con mucha frecuencia faltaron los próximos al centrómero.

El par 6 es también muy heteromórfico, con los brazos cortos casi enteramente eucromáticos, o si acaso con una o 2 bandas oscuras angostas de no más de 20% de heterocromatina; los brazos largos son, en cambio, heterocromáticos hasta en 60%, con telómeros prominentes en ambos extremos.

El par 7 es bastante uniforme en sus componentes, tanto en el número de bandas oscuras como en su ubicación en ambos brazos; el porcentaje total de heterocromatina en este par es semejante al de los pares 2 y 10, con las dos

10 u.r.

Fig. 2



bandas de los brazos cortos de posición y anchura casi idénticas; fuera del gran telómero distal, que llevan, los brazos largos son extensamente eucromáticos; no hay telómeros proximales en ninguno de los brazos.

El par 8 es más uniforme en cuanto a los parámetros básicos de sus componentes, lo mismo que en el número, la anchura y la distribución de las bandas oscuras en ambos homólogos; en los brazos cortos hay dos bandas y en los largos hay 3; se observaron telómeros distales en ambos brazos, pero proximales sólo en los largos; la heterocromatina representa 40% de la longitud total en este par.

En el par 9 los homólogos son, como en el par anterior, muy uniformes; cada brazo corto lleva dos bandas oscuras, una distal y la otra proximal, que suman alrededor de la mitad de la longitud de esos brazos; en los brazos largos hay dos bandas extensas de heterocromatina que representan más de 60% de su longitud.

El par 10 es otro formado por homólogos muy semejantes, con una sola banda heterocromática en forma de telómero distal en cada brazo corto, y tres bandas en los brazos largos, una, el telómero distal, y las otras dos, intermedias; no hay heterocromatina en las regiones vecinas al centrómero. La heterocromaticidad total de este par es de 40%.

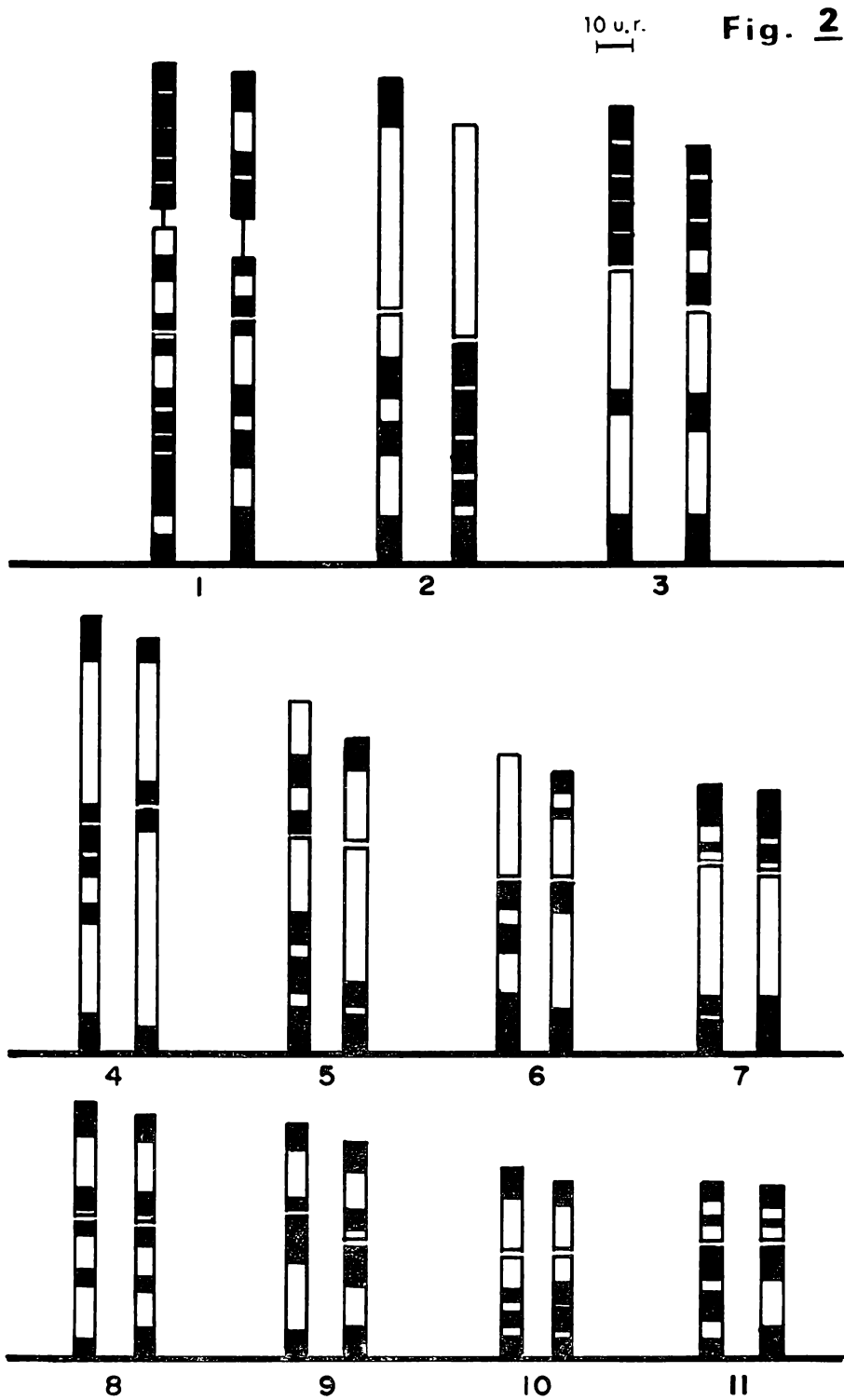
Los homólogos del par 11 son bastante uniformes, por lo menos en los brazos cortos, que son casi idénticos, con 2 bandas oscuras, una distal y la otra situada un poco antes del centrómero, que equivalen a 40% de la longitud de esos brazos; los largos difieren en que tienen de 2 a 3 bandas, con porcentaje de heterocromatina que va desde un medio a tres cuartas partes de su longitud; en ambos brazos hay telómeros distales, pero sólo en los largos los hay proximales.

Cromosomas somáticos de *Cupressus lusitanica*.

En la dotación somática de *C. lusitanica* hay solamente 3 pares de M, en tanto que el número de SM sube a 7; como en las dos especies anteriores, hay un solo A, que es el número 2 (como en *C. benthamii*), de 130 u. r., con satélite de 19 u. r., unido al brazo corto por un pedicelo de aproximadamente 16 u. r. Los M, 3, 4 y 7 miden 125, 97 y 84 u. r.; los 7 SM, que son los números 1, 5, 6, 8, 9, 10 y 11, miden 163, 94, 84, 76, 61, 56 y 28 u. r., respectivamente haciéndose notar que los 4 primeros de este grupo (1, 5, 6 y 8) son muy semejantes en longitud a los correspondientes de *C. benthamii*. El patrón de bandeado cromosómico somático de *Cupressus lusitanica*, que aparece en la figura 5, se describe como sigue:

El par 1 es bastante heteromórfico, con 3 a 4 bandas oscuras en los brazos cortos y 5 en los largos, pero en ambos casos de anchura y distribución muy irregulares, como lo es también la presencia de telómeros proximales, que con la misma frecuencia pueden verse en ambos cromosomas, como en sólo uno de ellos; alrededor de la mitad de la longitud cromosómica total está constituida por heterocromatina.

El par 2 lleva los grandes satélites, en los que hay una sola banda oscura terminal que representa aproximadamente la mitad de la longitud de esta es-



bandas de los brazos cortos de posición y anchura casi idénticas; fuera del gran telómero distal, que llevan, los brazos largos son extensamente eucromáticos; no hay telómeros proximales en ninguno de los brazos.

El par 8 es más uniforme en cuanto a los parámetros básicos de sus componentes, lo mismo que en el número, la anchura y la distribución de las bandas oscuras en ambos homólogos; en los brazos cortos hay dos bandas y en los largos hay 3; se observaron telómeros distales en ambos brazos, pero proximales sólo en los largos; la heterocromatina representa 40% de la longitud total en este par.

En el par 9 los homólogos son, como en el par anterior, muy uniformes; cada brazo corto lleva dos bandas oscuras, una distal y la otra proximal, que suman alrededor de la mitad de la longitud de esos brazos; en los brazos largos hay dos bandas extensas de heterocromatina que representan más de 60% de su longitud.

El par 10 es otro formado por homólogos muy semejantes, con una sola banda heterocromática en forma de telómero distal en cada brazo corto, y tres bandas en los brazos largos, una, el telómero distal, y las otras dos, intermedias; no hay heterocromatina en las regiones vecinas al centrómero. La heterocromaticidad total de este par es de 40%.

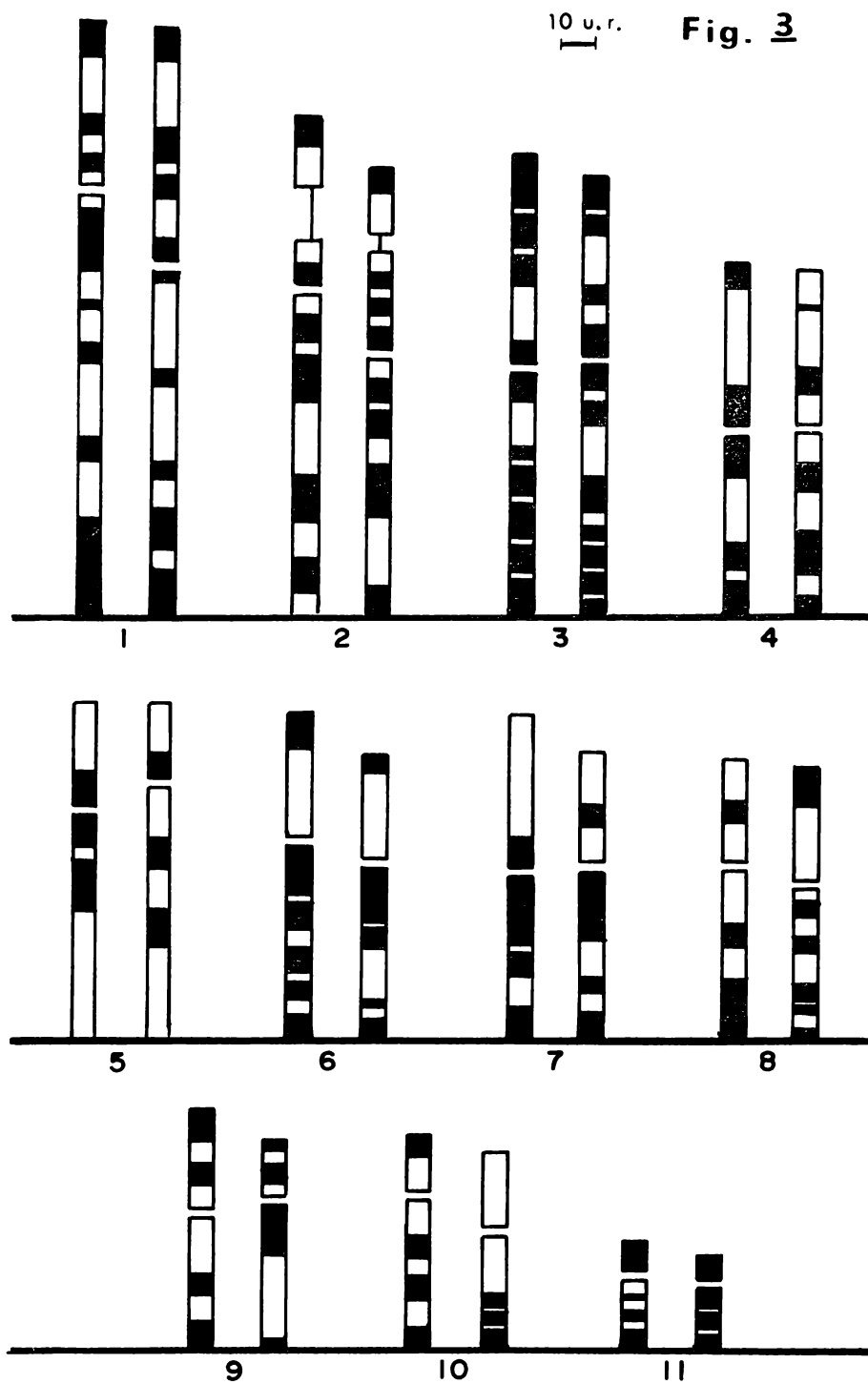
Los homólogos del par 11 son bastante uniformes, por lo menos en los brazos cortos, que son casi idénticos, con 2 bandas oscuras, una distal y la otra situada un poco antes del centrómero, que equivalen a 40% de la longitud de esos brazos; los largos difieren en que tienen de 2 a 3 bandas, con porcentaje de heterocromatina que va desde un medio a tres cuartas partes de su longitud; en ambos brazos hay telómeros distales, pero sólo en los largos los hay proximales.

Cromosomas somáticos de *Cupressus lusitanica*.

En la dotación somática de *C. lusitanica* hay solamente 3 pares de M, en tanto que el número de SM sube a 7; como en las dos especies anteriores, hay un solo A, que es el número 2 (como en *C. benthamii*), de 130 u. r., con satélite de 19 u. r., unido al brazo corto por un pedicelo de aproximadamente 16 u. r. Los M, 3, 4 y 7 miden 125, 97 y 84 u. r.; los 7 SM, que son los números 1, 5, 6, 8, 9, 10 y 11, miden 163, 94, 84, 76, 61, 56 y 28 u. r., respectivamente haciéndose notar que los 4 primeros de este grupo (1, 5, 6 y 8) son muy semejantes en longitud a los correspondientes de *C. benthamii*. El patrón de bandeado cromosómico somático de *Cupressus lusitanica*, que aparece en la figura 5, se describe como sigue:

El par 1 es bastante heteromórfico, con 3 a 4 bandas oscuras en los brazos cortos y 5 en los largos, pero en ambos casos de anchura y distribución muy irregulares, como lo es también la presencia de telómeros proximales, que con la misma frecuencia pueden verse en ambos cromosomas, como en sólo uno de ellos; alrededor de la mitad de la longitud cromosómica total está constituida por heterocromatina.

El par 2 lleva los grandes satélites, en los que hay una sola banda oscura terminal que representa aproximadamente la mitad de la longitud de esta es-



estructura; los brazos cortos son muy variables, con una a tres bandas oscuras, equivalentes a la mitad o algo más de su longitud; los brazos largos tienen 4 bandas anchas de heterocromatina de posición relativa más o menos semejante y que representan alrededor de 50% de esos brazos; la presencia de telómeros también es irregular.

El par 5 es el más heterocromático de los grandes y el segundo de esa característica en toda la dotación; hay 4 bandas oscuras en los brazos cortos, que representan más de 60% de su longitud, con telómeros distales y proximales constantes; los brazos largos llevan de 6 a 7 bandas oscuras muy anchas, que equivalen a más de 70% de su longitud, con telómeros constantes en ambos extremos.

El par 4 es muy regular en cuanto a parámetros básicos, lo mismo que en el número de bandas en ambos brazos, que son 2 en los cortos y 5 en los largos, pero no así en su distribución y anchura: la heterocromatina representa alrededor de un tercio de los brazos cortos y la mitad de los largos; la presencia de telómeros es muy irregular.

El par 5 es el menos heterocromático de todos; los brazos cortos llevan una sola banda en posición de telómero proximal, de alrededor de 30% de longitud de esos brazos; los brazos largos tienen dos bandas oscuras de diferente posición relativa y anchura, que equivalen a un poco más de un tercio de su longitud; no hay telómeros distales en ninguno de los brazos.

El par 6 tiene los brazos cortos muy semejantes, bastante eucromáticos, con sólo una banda oscura en posición de telómero distal, que representa de 20 a 30% de la longitud de esos brazos; no se observaron telómeros proximales. En contraste, los brazos largos son muy heterocromáticos, con 4 a 5 bandas oscuras, 3 de ellas coincidentes de anchura y posición relativa, que equivalen a las dos terceras partes de la longitud de esos brazos; ambos llevan telómeros distales y proximales prominentes.

El par 7 es bastante heteromórfico, con los brazos cortos extensamente eucromáticos, ya que sólo llevan una banda oscura de 20% de su longitud; no hay telómeros distales y los proximales son de ocurrencia irregular; los brazos largos muestran tres bandas oscuras casi coincidentes en anchura y distribución, que suman de 70 a 80% de la longitud de esos brazos; los telómeros distales son prominentes, pero los proximales lo son más aún.

El par 8, cuyos componentes son muy uniformes en parámetros básicos, es en cambio muy irregular en número, anchura y distribución de las bandas heterocromáticas; los brazos cortos llevan una banda de 25 a 35% de su longitud, sin telómeros proximales, y los distales son de aparición irregular; en los brazos largos hay desde 2 bandas anchas hasta 5 más angostas, que cubren, en ambos casos, la mitad de la longitud de esos brazos; hay telómeros distales, pero no proximales.

El par 9 sólo es uniforme en el número de bandas de heterocromatina en cada brazo, que es de dos en los cortos y dos en los largos, y en el porcentaje que representa ese material, que es de un poco más de la mitad (57%) en los cortos, y un poco menos de la mitad (42%) en los largos; en ambos hay telómeros distales, pero faltan los proximales o son muy irregulares en su aparición.

El par 10 es muy heteromórfico, los brazos cortos llevan a veces una sola banda oscura en posición de telómero distal, pero con la misma frecuencia son totalmente eucromáticos; los brazos largos tienen tres bandas oscuras, más o menos de la misma anchura, aunque no coincidentes en distribución y que equivalen a 60% de su longitud; hay telómeros distales, pero no proximales.

El par 11 es el más heterocromático de todos, con un porcentaje total de heterocromatina de 83 a 96. Los brazos cortos son totalmente heterocromáticos y en los largos se ven tres bandas oscuras que equivalen a un porcentaje de heterocromatina de 66 a 95; en ambos brazos hay telómeros aunque no siempre se observan los proximales.

DESCRIPCIÓN DE LA MEIOSIS

Puesto que no fue posible conseguir material procedente de Portugal para el estudio meiótico de *Cupressus lusitanica* la observación del ciclo cromosómico microsporogénico se hizo únicamente en las especies de las que se obtuvo material de México, es decir, en *C. benthamii* y *C. lindleyi*, de manera que la descripción y comparación de los eventos meióticos se harán con referencia a estas dos especies.

No se observaron divisiones somáticas premeióticas en las células tapetales, ni cambios que indicaran que ciertas células se preparaban para entrar en meiosis, y que las diferenciaban de las restantes células somáticas.

La considerable cantidad de material estudiado permitió distinguir con claridad la secuencia de las fases meióticas, sobre todo porque los microsporocitos mostraron escasas granulaciones de resina en el citoplasma que interfirieran con la tinción y la diseminación cromosómica; así, con excepción del estadio leptoténico, que no pudo verse en ninguna de las dos especies, lo que parece indicar que es muy fugaz, todas las demás fases y estadios se observaron con precisión.

PROFASE I: ZIGOTENO. En las dos especies los cromosomas se mostraron congregados en el centro de la célula, permaneciendo así hasta el diploteno sin que fuera posible desenmarañarlos con las técnicas usuales de laboratorio; se optó por no emplear disociantes drásticos a fin de no alterar la estructura de los cromosomas. En este estadio los homólogos ya mostraron sinapsis en toda su longitud; en algunas figuras de *C. lindleyi* se observaron con claridad los satélites; este estadio fue semejante en las dos especies. La figura 5 muestra el zigoteno de *C. lindleyi*.

PAQUITENO. Los cromosomas son más cortos y gruesos que en el estadio anterior y en algunas figuras avanzadas pudieron contarse ya los 11 pares; el nucleólo, estructura típica de los estadios paquiténico, diploténico y diacinéptico, no se observó aquí ni en los siguientes. El paquiteno de *C. benthamii* (fig. 6) es menos claro por adherencia de los cromosomas que el de *C. lindleyi*.

DIPLOTENO. Aquí se observó claramente la terminalización de los quiasmas entre homólogos, que es típica de este estadio; pudieron notarse algunos pormenores de la estructura cromosómica. La figura diploténica se halló abundante-

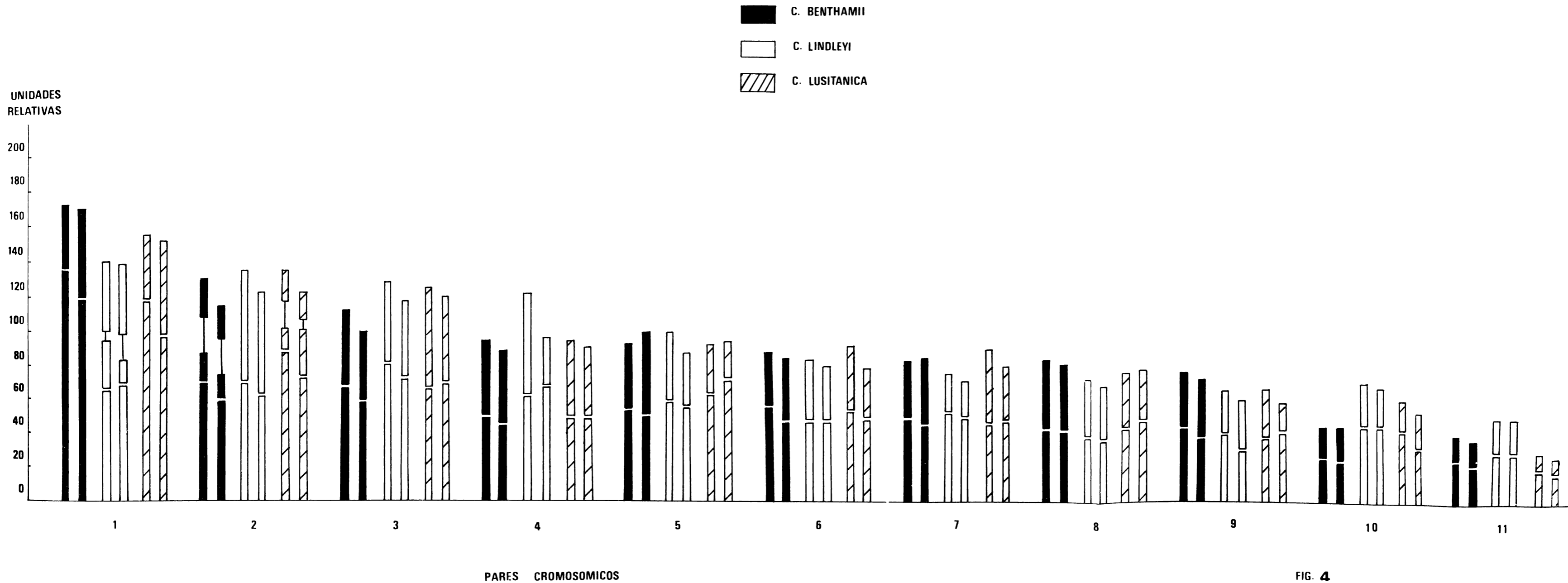


FIG. 4

mente en ambas especies, aunque en *C. benthamii* (fig. 7) los cromosomas parecieren más frágiles que en *C. lindleyi*.

DIACINESIS. En ninguna de las dos especies se observaron las configuraciones cromosómicas típicas de la diacinesis (anulares, en V o en X). Además, este estadio se encontró escaso y confuso en *Cupressus benthamii*, ya que los cromosomas permanecieron congregados en asociaciones que se insinuaban desde el diploteno y cuyo origen y significado se intentará explicar en el capítulo siguiente. En cambio, en *C. lindleyi* (fig. 8) la figura es más clara, pero también se observan asociaciones como las mencionadas en la especie anterior.

METAFASE I. Aunque se supone que en esta fase alcanzan los bivalentes su grado máximo de condensación, en ninguna de las figuras observadas se les halló típicamente condensados, sino semejando una diacinesis avanzada, poco clara, ya que los cromosomas permanecen juntos dificultando su identificación, sobre todo en *C. benthamii*. Con relación a esta fase conviene señalar algo que tal vez merezca alguna discusión más adelante, y es el hecho de que, en tanto algunos pares tienen configuración metafísica, otros conservan la diacinéctica hasta bien avanzada la metafase, como puede apreciarse en la figura 9, que corresponde a la metafase I de *C. lindleyi*.

ANAFASE I. Aparentemente no existen diferencias notables entre las figuras anafásicas normales de las dos especies, en las que fue posible contar los cromosomas en los dos grupos. En ambas especies se observaron diversas anomalías cromosómicas con una frecuencia mucho mayor de lo que sería de esperarse normalmente, sobre todo en *C. benthamii*; dichas anomalías fueron: retraso o adelanto de uno a dos pares, indiferenciación y posible pérdida de un par, y la formación de puentes cromosómicos debidos a inversiones paracéntricas heterocigóticas acompañadas de cruzamiento factorial en número impar, así como también a la ocurrencia de translocaciones recíprocas heterocigóticas, involucrando, dos de los pares de cromosomas, como se observa en las figuras 10 y 13, que muestran anafases I anómalas de *C. benthamii* y *C. lindleyi* respectivamente. Para una mejor comprensión de estos fenómenos se adjuntan las figuras 11 y 12 que son esquemas a tinta de las dos últimas fotografías.

TELOFASE I. No fue frecuente la observación de los dos grupos de cromosomas congregados en los polos opuestos del microsporocito, lo que hace suponer que esta fase sea fugaz; al parecer, los cromosomas, aunque permanecen juntos, no pierden su identidad y no se integran en núcleos interfásicos intermedios entre la meiosis I y II, como suele verse en especies de vegetales superiores. Esta fase fue semejante en ambas especies.

PROFASE II. Las figuras correspondientes a esta fase sólo pudieron hallarse en *C. lindleyi* (fig. 14). No parece posible adelantar ninguna explicación de por qué no se observó esta fase en el centenar de preparaciones que se hicieron de *C. benthamii*, en las que se logró ver todas las demás fases. En la figura 14 los cromosomas se ven más largos y delgados que en las fases anteriores, por lo que se supone que aquí pasan por una nueva etapa de desespiralización.

METAFASE II. No se encontró ninguna diferencia notable entre las figuras correspondientes a esta fase en las especies, la figura 15 corresponde a *C. lindleyi*;

todas fueron bastante claras y en algunas los cromosomas se ven con las cromátidas separadas, asumiendo configuraciones de X, los metacéntricos, de Y, los submetacéntricos, y de V los acrocéntricos.

ANAFASE II. En relación a esta fase no hubo diferencias entre las dos especies y puede verse en la figura 16 el presente estadio en *C. lindleyi*; todas fueron abundantes y muy claras en cuanto a la distribución del material en 4 grupos. También aquí se notaron anomalías, aunque, aparentemente, no con la frecuencia que alcanzaron en las anafases I, como quedó dicho en su oportunidad; entre otras se vieron puentes cromosómicos muy delgados, como era de esperarse, así como anomalías del huso divisorio, que en fases anteriores no se observaron y que en ocasiones conectaron 5 de los 4 núcleos resultantes, y aún a los 4, como ocurre en las divisiones multipolares somáticas propias de tejidos cancerosos.

TELOFASE II. Como la telofase I, ésta fue también poco frecuente, por lo que se supone que es una fase fugaz en ambas especies. Rodeando a cada uno de los 4 núcleos se observa una zona más clara de citoplasma, que probablemente sea la cavidad nuclear, alrededor de la cual se formará la membrana nuclear de cada célula de la cuarteta. En ocasiones se observó a las fibras del huso uniendo a los cuatro núcleos resultantes (fig. 17), así como retraso cromosómico que afecta a dos de los núcleos de la cuarteta (fig. 18).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con el objeto de poder hacer comparaciones válidas entre los cariotipos de las tres especies de *Cupressus* de que se da cuenta en este trabajo, se empleó de intento una sola técnica citológica que, como ya se dijo, fue la del aplastamiento ("squash") en carmín acético; o sea que las 3 especies recibieron exactamente el mismo tratamiento. Fue posible también, con las reservas debidas a las diferencias técnicas empleadas en estos casos, comparar estos datos con los pocos que existen en la literatura sobre características cariotípicas básicas de *C. lusitanica* y de *C. lusitanica* var. *benthamii*, aunque debido a diferencias en la interpretación sistemática del grupo, no se tiene la certeza a qué taxón de los estudiados en este trabajo pueda pertenecer el material referido a la variedad *benthamii*, y aún con los de siete especies del género nativas del oeste y suroeste de los Estados Unidos de América.

En lo que se refiere al patrón de bandeo cromosómico, de lo que no hay en la literatura información alguna acerca de las especies de *Cupressus*, en las poquísimas especies animales de las que se ha dado a conocer dicho patrón, éste se representa usualmente en dotación haploide, porque se supone que debe ser exactamente igual en los dos cromosomas de cada par. En este trabajo se representa el bandeo en dotación diploide, por lo que es necesario señalar las razones que se tuvieron para ello; nunca se halló el mismo patrón de bandas en ambos componentes del par, sino que más bien lo común fue observar patrones bastante parecidos, pero no iguales. No debe extrañar que esto sea así, puesto que prácticamente en todas las especies estudiadas cromosómicamente es bien conocido el hecho de que muchas estructuras marcadoras de cromosomas

como son la constricción nucleolar y otras constricciones secundarias menos conspicuas, los satélites, los telómeros y los cromómeros intercalares pueden aparecer en condición heterocigótica, o sea que pueden estar presentes en uno de los homólogos pero no en el otro, como consecuencia de cruzamiento factorial desigual (que duplica una región en uno de los homólogos y la suprime en el otro), de translocaciones simples o recíprocas, u otro rearrreglo de los que se acostumbra postular como mecanismos de variabilidad o polimorfismo cromosómico.

El número cromosómico somático de las tres especies fue de $2n = 22$. Ya en 1956 Numata y Yamashita (op. cit.) habían comunicado este número para lo que ellos denominaron *C. lusitanica* var. *benthamii*, y también Hunziker en 1958 y en 1961; y en 1946 Camara y De Jesús para *C. lusitanica*, como tal.

No obstante la concordancia en número, los datos cariotípicos que se dan aquí para las tres especies difieren considerablemente de los publicados por los autores mencionados antes. Así, por ejemplo, se halló que es constante la presencia de un gran satélite lineal en el par 2 de *C. benthamii* y *C. lusitanica*, y en el par uno en *C. lindleyi*, lo que difiere de lo asentado por Camara y De Jesús (op. cit.) quienes hallaron que en *C. lusitanica* es el par 6 el poseedor del satélite, y de lo comunicado por Hunziker (1961), quien halló satélites, tanto lineares como esferoidales, en el par 6 de *Cupressus lusitanica* var. *lusitanica* y *C. lusitanica* var. *benthamii*; este último autor también señala el hallazgo de varias clases de cariotipos, en ambos taxa.

Como puede verse en las figuras 1, 2 y 3, que muestran por separado los idiogramas de *C. benthamii*, *C. lindleyi* y *C. lusitanica*, respectivamente, y la figura 4, que los representa de manera comparada, las dotaciones de las tres especies, en cuanto a número de cromosomas metacéntricos (M), submetacéntricos (SM) y acrocéntricos (A), quedan así:

C. lindleyi = 5M, 5SM y 1A

C. benthamii = 5M, 5SM y 1A

C. lusitanica = 3M, 7SM y 1A

Esta disposición de las posiciones relativas de los centrómeros dista mucho de la que presentan Camara y De Jesús (op. cit.) y Hunziker (1961), quienes sólo hallaron en *C. lusitanica* y *C. lusitanica* var. *lusitanica* y *C. lusitanica* var. *benthamii*, respectivamente, cromosomas metacéntricos y, cuando más, uno o dos pares de submetacéntricos, pero no acrocéntricos; además, las longitudes relativas en los cariotipos de esos autores distan mucho de ser las mismas o parecidas a las que se hallaron aquí y no existen cromosomas tan cortos proporcionalmente como los pares 10 y 11.

Si se admite, de acuerdo con Ohno (1970) y con Stebbins (1971) que en la evolución de las especies, y aún en la diversificación de taxa supraespecíficos, juega un papel primordial la duplicación génica y, como última consecuencia de ésta, la duplicación de regiones cromosómicas más o menos extensas, y si se considera que la eucromatina es genéticamente activa, en tanto que la heterocromatina no lo es, se entiende que el primero de estos materiales, en razón de

su valor genético, irá aumentando en proporción relativa al total cromosómico mientras el segundo disminuye conforme avanza la evolución de formas más recientes a partir de una ancestral. De tal manera, si se toma en consideración el porcentaje total de eucromatina en orden creciente en las dotaciones de las tres especies, éstas quedarán ordenadas así:

ESPECIE	% DE EUCROMATINA TOTAL
<i>C. lusitanica</i>	50
<i>C. lindleyi</i>	58
<i>C. benthamii</i>	65

Lo que sugiere que *C. lusitanica* podría ser ancestral con respecto a las otras dos y que *C. benthamii* es la más evolucionada.

De igual manera, si la duplicación de regiones comprende, como parece lógico (Stebbins, op. cit.), también a la constricción organizadora del nucléolo, se observa que esta región es más larga en *C. benthamii* (21 u. r.) que en *C. lusitanica* (9 u. r.), si bien en *C. lindleyi* (7 u. r.) no muestra el aumento proporcional intermedio a las otras dos especies, como sería de esperarse; de todos modos la región organizadora del nucléolo en *C. benthamii* es más de dos veces mayor que la de *C. lusitanica*.

Al comparar, par por par, las dotaciones de las tres especies, tomando en consideración los parámetros básicos, como longitud total, relación entre brazos y posición relativa del centrómero y características cariotípicas más finas, como porcentaje de eucromaticidad total y parcial de los brazos, y número y distribución de bandas heterocromáticas, y si, para facilitar la lectura se suprime la designación genérica, se encuentra que *lusitanica* se parece más a *lindleyi* que a *benthamii* en 5 pares, en dos pares se parece más a *benthamii* que a *lindleyi* y en 4 pares es diferente a las otras dos especies; en cambio, *lindleyi* se parece más a *lusitanica* que a *benthamii* en 4 pares, en tres se parece más a *benthamii* que a *lusitanica*, y en 4 pares difiere de las otras dos especies; por último, *benthamii* se parece más a *lindleyi* que a *lusitanica* en dos pares, en dos pares se parece más a *lusitanica* que a *lindleyi* y en 7 pares difiere de las otras dos especies. Para mayor claridad estos datos se representan gráficamente en la figura 19, en la que puede verse la semejanza entre *lusitanica* y *lindleyi* que comprende de 4 a 5 pares de cromosomas, en tanto que su parecido cariotípico con *benthamii* sólo consiste en dos pares; y las relaciones de semejanza entre *lindleyi* y *benthamii* abarcan de dos a tres pares. De igual manera, si se juzgan las relaciones de parentesco entre las tres especies por el número de pares en que difieren unas de otras, se encuentra que, mientras *lusitanica* y *lindleyi* poseen cada una 4 pares que no tienen equivalentes en las otras dos especies, *benthamii* difiere de aquéllas en 7 pares; de manera que aquí también se entrevé una posible relación de parentesco que va de *lusitanica* a *lindleyi* y, por último a *benthamii*.

Con respecto al proceso de la meiosis en *Cupressus benthamii* y en *Cupres-*

sus lindleyi, ambas especies mostraron numerosas anomalías de varios tipos durante la meiosis, siendo éstas más frecuentes en *C. benthamii*.

Desde el paquiteno se encuentran los pares de homólogos muy congregados, lo que sugirió la ocurrencia de translocaciones recíprocas heterocigóticas, cuya existencia se comprobó más tarde en la anafase, y ésta podría ser la explicación de que el diploteno, la diacinesis y la metafase I sean en general poco claras, como puede verse en las figuras 7, 8 y 9.

En la metafase I de las dos especies no se observó con claridad la disyunción de los homólogos, como era de esperarse si se atiende a la ocurrencia de asociaciones como las que se mencionaron en el caso de la profase; además y sobre todo en *C. lindleyi* no se observó la espiralización máxima que se considera típica de esta fase, ya que los bivalentes conservaron su apariencia diacínética a través de ella; no se halló en la literatura ninguna explicación para este fenómeno.

En ambas especies se observaron numerosas anomalías en la anafase I, al grado de que en *C. benthamii* se contaron más anafases anómalas que normales. Las principales aberraciones que se identificaron fueron: retraso o adelanto en la disyunción en uno o dos pares de cromosomas; indiferencia de fragmentos cromosómicos y aun de bivalentes aparentemente normales; formación de puentes indicadores de inversiones paracéntricas heterocigóticas con cruzamiento factorial, como se muestra en las figuras 10 y 15, cuya interpretación esquemática se da en las figuras 11 y 12, en las que pueden verse puentes por inversión y por translocación.

En la telofase I se observó también retraso, adelanto o indiferencia de algunos cromosomas.

La profase II, que sólo se observó en *C. lindleyi*, mostró cromosomas demasiado espiralizados y, aparentemente, asociados de manera anormal.

La anafase II presentó anomalías, pero con menor frecuencia que en la anafase I; se apreciaron puentes cromosómicos, a veces hasta en número de 4 por cada par de núcleos; y anomalías del huso, que en ocasiones se vio tripolar y hasta tetrapolar, como se aprecia en la figura 17.

Por el hallazgo de tan variadas anomalías meióticas observadas con tanta frecuencia en las dos especies estudiadas, y en atención a que son de las que redundan en grados variables de esterilidad gamética, no parece sorprendente el hecho de que al someter a germinación las semillas para la obtención de radículas se observó un grado muy alto de inviabilidad, que en ocasiones alcanzó 90% en algunas muestras. Este hecho ya había sido señalado por Thomas y Goggans (1972, op. cit.) para varias especies de *Cupressus* distintas a las que se estudiaron aquí.

Otro resultado de la ocurrencia de anomalías cromosómicas, tanto estructurales como de comportamiento, en estas especies de *Cupressus*, es el polimorfismo cromosómico con todas las consecuencias que pueda tener en la especiación. Esto lo han comunicado ya varios autores como por ejemplo, Camara y De Jesús (op. cit.), en *C. lusitanica*, Hunziker (op. cit.), en *C. arizonica*, *C. funebris*, *C. glabra* y *C. lusitanica*, y Thomas y Goggans (op. cit.), en 7 especies del

oeste y suroeste de los Estados Unidos de América, quienes concluyen que la existencia innegable de variedades, formas o razas se explicaría por el mencionado polimorfismo cromosómico.

Con relación a las notables diferencias que se observan entre los cariotipos presentados aquí y los propuestos por otros autores, cabe postular que la razón principal de tales diferencias puede hallarse en el empleo muy frecuente de técnicas que comportan demasiados pasos, desde el pretratamiento con diversos agentes (paradiclorobenceno, 8-hidroxiquinolina, etc.), con el fin de contraer al máximo a los cromosomas y detener al proceso mitótico en metafase, hasta las tinciones fuertes con uno o más colorantes, seguidas de disociaciones con ácido clorhídrico al calor o en frío. Si bien es cierto que con estos procedimientos se logran con frecuencia figuras con los cromosomas tan dispersos que las cuentas resultan precisas, también lo es que los múltiples tratamientos alteran la naturaleza de los cromosomas, al grado de que en muchas de las ilustraciones que aparecen en la literatura, aquéllos parecen barras compactas en las que se ha perdido casi todo rastro de estructuración, y tan acortadas que los errores de medición se agrandan, con la consiguiente confusión y dificultad en homologarlos y describirlos. En cambio, el uso de una técnica sencilla bien dominada, como la de aplastado en carmín acético, sin pretratamientos contractores ni disociantes posteriores, da resultados satisfactorios como los que están a la vista en las ilustraciones de este trabajo.

Otra razón de diferencias cariotípicas puede estar en la búsqueda de cromosomas en otros tejidos que no sean el meristemo radicular, que si bien en él están en división activa y por ello ofrece la posibilidad de observar células en mitosis, tiene la desventaja de que los cromosomas pueden ser distintos en longitud, aspecto y comportamiento en la placa metafásica. Así, Camara y De Jesús (op. cit), dejan bien claro que en las coníferas los cromosomas somáticos del meristemo radicular son muy largos y se curvan mucho en metafase, por lo que son difíciles de estudiarse, y que son mejores los de las hojas muy tiernas, y aún los del endospermio (haploide), como preconizan Sax y Sax; pero al comparar las figuras de mitosis en *Cupressus lusitanica* que ilustran el trabajo de Camara y De Jesús, con las figuras obtenidas aquí de la misma especie y del mismo origen, no resalta ninguna de las ventajas señaladas por dichos autores, y en cambio se ponen de manifiesto muchos datos cariotípicos que quedaron completamente oscurecidos en aquellos materiales y con aquellas técnicas. Lo mismo puede decirse de las ilustraciones de Hunziker, aunque no ha sido posible averiguar qué material (cultivado) estudió este autor bajo la denominación de *Cupressus lusitanica* var. *lusitanica* y *C. lusitanica* var. *benthamii*.

De los datos obtenidos en este estudio puede concluirse que, sobre la base de características cariotípicas, observadas a un grado de precisión no alcanzado antes de ahora, las tres formas: *Cupressus lusitanica*, *C. lindleyi* y *C. benthamii* son entidades distintas, de las cuales la primera parece ser forma ancestral de las otras dos. En las tres ocurren con mucha frecuencia anomalías meióticas de varias clases, y, puesto que son de las que resultan en la formación de gametos defectuosos, pueden ser la causa de la alta inviabilidad que se observó en las

semillas. Por último, de esas anomalías meióticas, aquellas que sean tolerables y transmisibles pueden originar el polimorfismo cromosómico y el polimorfismo morfológico intraespecífico que mencionan, sin pasar del nivel de mera especulación, algunos autores como Camara y De Jesús y Hunziker, que podrían también explicarse por deficiencias en la observación cromosómica. Definitivamente no se observó en este estudio ningún polimorfismo cromosómico reflejado en la existencia de varias clases de cariotipos dentro de una misma especie.

SUMMARY

These are the results obtained in a comparative study of the somatic chromosomes of *C. lusitanica*, *C. benthamii*, and *C. lindleyi*; the seeds of the first species were sent from Portugal; the seeds of the second species were collected from several localities of the States of Hidalgo and Veracruz and those of the third from localities of the States of Guerrero, Hidalgo, Mexico and Michoacan. The microsporocytic chromosomes of the two last species were studied also. In all cases the cytologic technique employed was that of the squash in aceto-carmin, that proved good enough even for revealing the banding pattern of the somatic chromosomes.

The somatic numbers found in the three species were $2n = 22$, which are reported a new for the first species, and those of the second and third is only a confirmation of previous reports. The karyotypes of the species are advanced in accordance with the parameters accepted everywhere, and we point out some differences in our findings in comparison to what has been proposed previously for *C. lusitanica*.

For the first time we offer the banding pattern of the somatic chromosomes of the three species in the hope it would be of some help for clarifying their phylogenetic relationships.

The microsporocytic number $n = 11$ in the first species is also given for the first time, and we point out the common occurrence of chromosomal aberrations both structural and behavioral, such as inversions, translocations, and lagging with the formation of chromosome bridges consecutive to those aberrations.

Taking into account the similarities and differences in the karyotypes, as well as the percentage of both the euchromatic and heterochromatic content per individual chromosome and per chromosome set, a phylogenetic scheme of interrelationships is tentatively proposed for the three species mentioned.

BIBLIOGRAFÍA

- BELLING, J., 1926. The iron aceto-carmin method of fixing and staining chromosomes. *Biol. Bul.* 50: 160-162.
- BURNHAM, CH. R., 1951. Cytogenetics notes. University of Minnesota (mecanografiado).
- CAMARA, A., A. DE JESÚS, 1946. Un estudio citológico de *Cupressus lusitanica* Miller. *Agronomía Lusitana*, 8 (2): 95-122.
- CAMUS, A., 1914. Les Cyprès (genre *Cupressus*). *Encyclopedie Economique de Sylviculture*- II. Paris 106 pp.
- CARRIERE, E. A., 1867. *Traité Général des Conifères*, 2 ème. Ed. Paris. 143-175.

- CHICAGO CONFERENCE, 1966. Standardization in human cytogenetics. Birth defects: original article series II: 2: 1-11. The National Foundation, New York.
- DENVER CONFERENCE, 1960. A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *The Lancet* 1: 1063-1065.
- FRANCO, J. DO A., 1949. De l'expansion culturale du cyprès de Bussaco en Portugal. XVI^e Congrès International de Géographie, Lisbonne, p. 775-780.
- HERNÁNDEZ-CORZO, A., 1954. Una técnica citológica rápida para la identificación de haploides en maíz. *Cosmos y Ciencia* 1 (2): 1-9.
- HEYWOOD, B. H., 1968. Taxonomía Vegetal. Ed. Alhambra, S. A. Madrid, 77 pp.
- HUNZIKER, J. H., 1958. Karyotype analysis in *Cupressus* and *Libocedrus*. Proc. X Internat. Congr. of Genetics 2: 128-129.
- 1961. Estudios cromosómicos en *Cupressus* y *Libocedrus* (Cupressaceae). *Rev. Invest. Agric.* 15 (2): 169-185.
- LONDON REPORT, 1963. The London conference on the normal human karyotype. *Cytogenetics* 2: 264-268.
- MARTÍNEZ, M., 1947. Los *Cupressus* de México. *An. Inst. Biol. Méx.*, 18 (1): 71-149.
- MASTERS, M., 1895. A general view of the genus *Cupressus*. *Journ. Linn. Soc.* 31: 312-363.
- MEHRA, P. N. & T. N. KHOSHOO, 1948. Proc. 34th. Indian Sci. Congr. pt. 3: 167.
- 1956. Cytology of conifers *Jour. Genet.* 54: 165-180.
- MOORE, D. M., 1968. The Karyotype in taxonomy. In V. H. Heywood, Modern methods in plant taxonomy. Botanical Society of the British Isles. London. Conference report. No. 10. p. 61-76.
- OHNO, S., 1970. Evolution by Gene Duplication. Springer-Verlag, New York. 160 pp.
- PARIS CONFERENCE, (1971). Standardization in human cytogenetics Birth defects: original article series, 8 (7): 1-46, New York: The National Foundation, 1972.
- SAX, K. & SAX, 1933. Chromosome number and morphology in the conifers. *Jour. Arnold Arbor.* 14: 356-375.
- STANDLEY, P. C., 1920. Trees and shrubs of Mexico. *Contr. U. S. Nat. Herb.* 23 (1): 62-63.
- 1950. El ciprés centroamericano. *Ceiba* 1: 180-185.
- STANDLEY, P. C. & J. A. STEYEMARK, 1958. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany 24 (1): 26-32.
- STEBBINS, G. L., 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Adison-Wesley Publishing Co. London. 216 pp.
- THOMAS, G. E. & J. F. GOGGANS, 1972. A karyotypic study of Cypresses indigenous to the southwestern United States. *Agr. Exp. Sta. Auburn Univ.*, Circular 201: 1-24, Alabama.
- WOLF, C. B. & W. E. WAGENER, 1948. The new world cypresses. *El Aliso* 1 (1): 1-250.

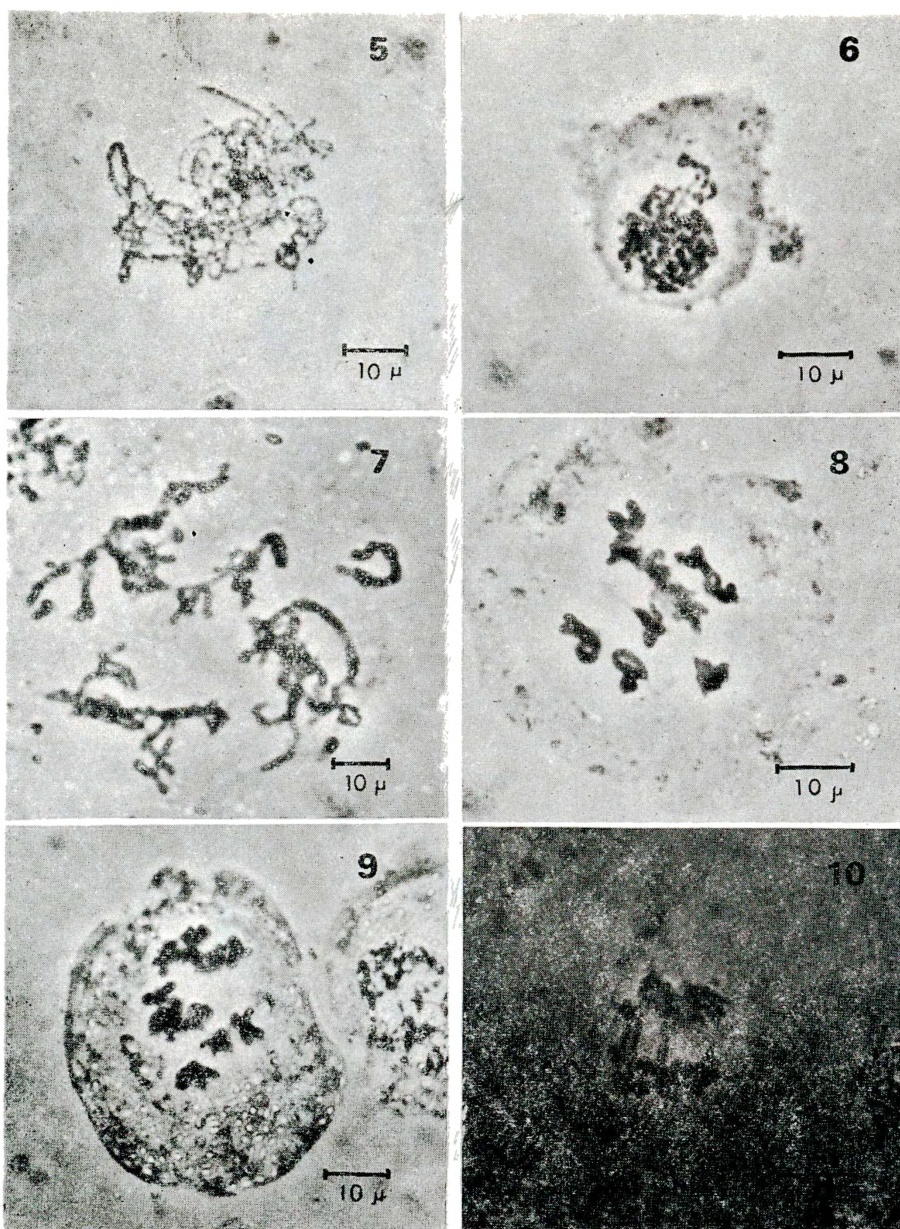


FIG. 5. Zigoteno de *Cupressus lindleyi*.

FIG. 6. Paquiteno de *Cupressus benthamii*.

FIG. 7. Diploteno de *Cupressus benthamii*.

FIG. 8. Diacinesis de *Cupressus lindleyi*.

FIG. 9. Metafase I de *Cupressus lindleyi*.

FIG. 10. Anafase I anómala de *Cupressus benthamii*, que muestra un puente por inversión y otro por translocación entre dos pares.

Fig. 11



Fig. 12

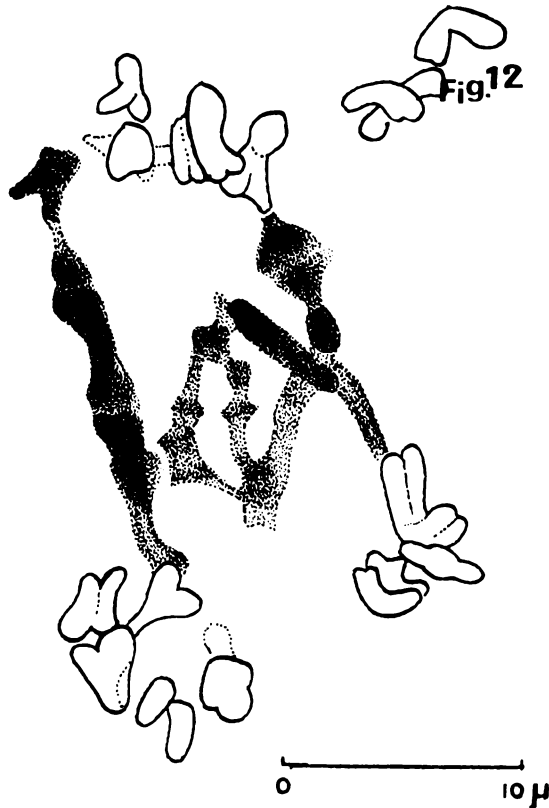


FIG. 11. Esquema de la figura 10.

FIG. 12. Esquema de la figura 13.

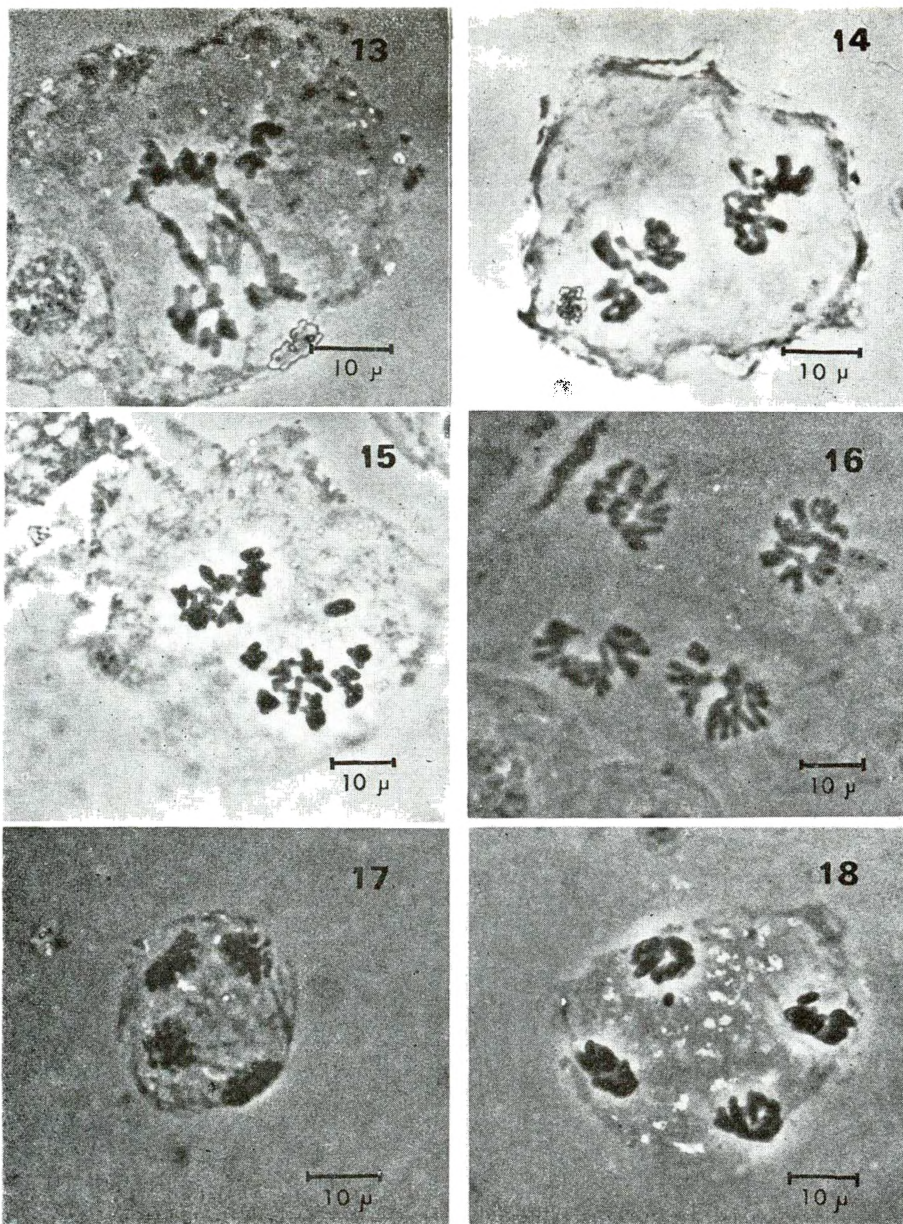


FIG. 13. Anafase I anómala de *Cupressus lindleyi* que muestra un puente por inversión y otro por translocación entre dos pares.

FIG. 14. Profase II de *Cupressus lindleyi*.

FIG. 15. Metafase II de *Cupressus lindleyi*.

FIG. 16. Anafase II de *Cupressus lindleyi*.

FIG. 17. Telofase II de *Cupressus benthamii* (avanzada) mostrando claramente husos multipolares.

FIG. 18. Telofase II de *Cupressus lindleyi* (avanzada) mostrando retraso de un cromosoma en dos de los núcleos de la cuarteta.

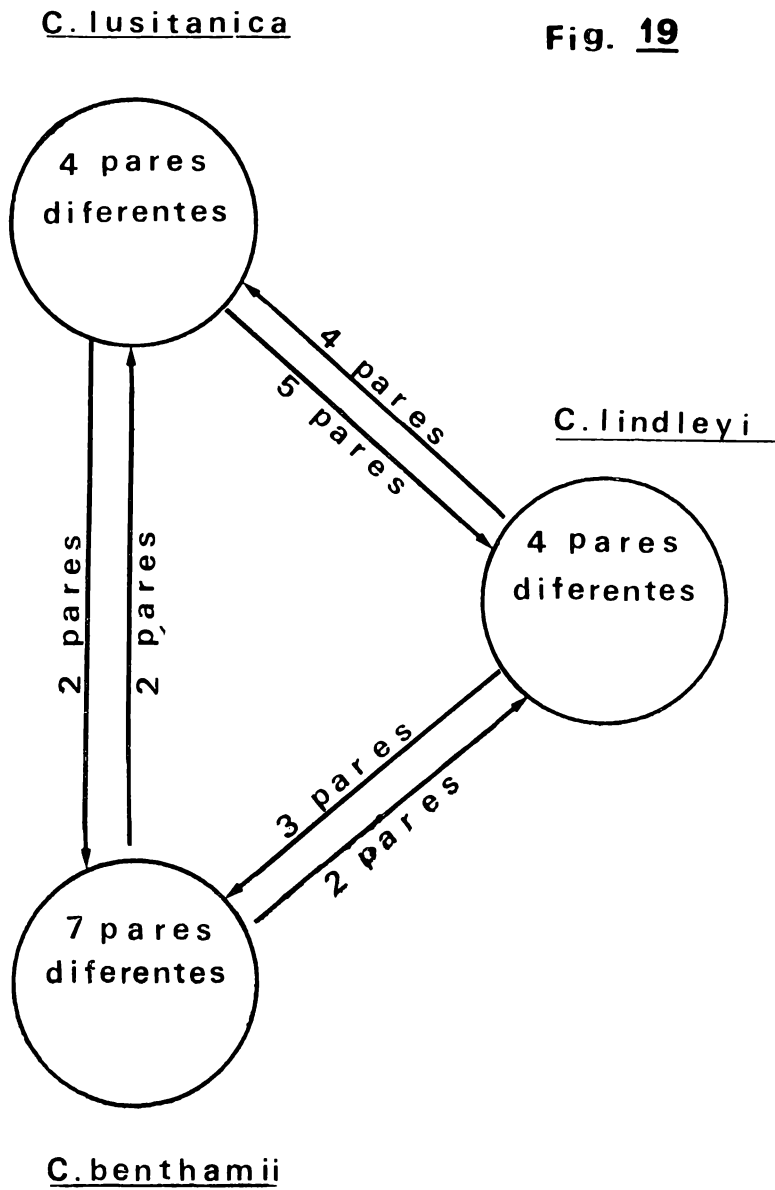


FIG. 19. Relaciones intercromosómicas en *Cupressus lusitanica*, *C. lindleyi* y *C. benthamii*. Las flechas indican el número de pares en que son semejantes las especies conectadas.