

MALFORMACIÓN POLÍNICA Y NIVELES DE PLOIDÍA EN *RANUNCULUS GREX PARNASSIIFOLIUS*

Eduardo CIRES^{1*}, Candela CUESTA², María Ángeles FERNÁNDEZ CASADO¹,
María del Carmen FERNÁNDEZ-CARVAJAL¹ y José Antonio FERNÁNDEZ PRIETO¹

¹Universidad de Oviedo, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas,
Catedrático Rodrigo Uría s/n, 33071 Oviedo, Spain.

²Department of Plant Systems Biology, VIB, Technologiepark 927, 9052 Gent, Belgium.

*Autor para correspondencia: cireseduardo@gmail.com

Recibido el 6 de septiembre de 2011, aceptado para su publicación el 5 de octubre de 2011

RESUMEN. *Malformación polínica y niveles de ploidía en Ranunculus grex parnassiifolius.* Se presenta un estudio sobre la malformación polínica en *Ranunculus grex parnassiifolius*, un complejo poliploide cuya distribución va desde las montañas del noroeste de la Península Ibérica hasta la mayor parte de los macizos alpinos. El resultado más notable es la baja viabilidad de polen en las poblaciones tetraploides (85,27% de polen no viable) en comparación con las poblaciones diploides (17,72%); y se considera como una prueba de la existencia de procesos reproductivos parcialmente apomicticos.

Palabras clave. Citometría de flujo, citotipos, nivel de ploidía, polen, *Ranunculus parnassiifolius*.

ABSTRACT. *Pollen malformation and ploidy levels in Ranunculus grex parnassiifolius.* A survey of pollen malformation in *Ranunculus grex parnassiifolius*, a polyploid complex distributed from the northwestern mountains of the Iberian Peninsula to the most alpine massifs, is presented. The most remarkable result is the low viability of pollen in tetraploid populations (85.27% of nonviable pollen) compared to diploid populations (17.72%); and is considered as a proof of the existence of partial reproductive apomictic processes.

Keywords. Flow cytometry, cytotypes, ploidy level, pollen, *Ranunculus parnassiifolius*.

INTRODUCCIÓN

El género *Ranunculus* L. cuenta con aproximadamente unas 600 especies (Tamura, 1993, 1995) y numerosas razas apomicticas (Hörandl *et al.*, 2005), distribuidas desde

las zonas templadas hasta las zonas árticas y subantárticas (Ziman & Keener, 1989), siendo raras en los trópicos, donde están restringidas a zonas de alta montaña (Tamura, 1993, 1995). La sección *Ranuncella* (Spach) Freyn del género *Ranunculus* en su concepción actual, excluido

R. kuepferi Greuter & Burdet (Cosendai & Hörandl, 2010; Hörandl *et al.*, 2005), incluye un grupo de especies de las cuales la mayoría (*R. abnormis* Cutanda & Willk., *R. acetosellifolius* Boiss., *R. amplexicaulis* L., *R. angustifolius* DC., *R. bupleuroides* Brot. y *R. pyrenaicus* L.) son endémicas de la Península Ibérica. *R. calandrinioides* Oliv. es endémica de las montañas del norte de África y en este territorio crece *R. gramineus* L., cuyo área de distribución se extiende por la Península Ibérica y alcanza Francia, Italia y Suiza. Las plantas de la citada sección sistematizadas como *Ranunculus parnassiifolius* L. (sensu Küpfer, 1974) tienen una distribución más amplia, desde el extremo occidental de la Cordillera Cantábrica (NO de la Península Ibérica), incluyendo los Pirineos y los Alpes, hasta las Montañas de Korab en la República de Macedonia (Jalas & Suominen, 1989; Tutin & Akeroyd, 1993).

Las plantas incluidas en la sección *Ranuncella* son diploides ($2n=16$); únicamente en *Ranunculus* grex *parnassiifolius* se conocen además de plantas diploides, otras poliploides, fundamentalmente tetraploides ($2n=32$). Los primeros recuentos de números de cromosomas en *R. grex parnassiifolius* fueron realizados en plantas alpinas (Langlet, 1936; Tischler, 1950), resultando en ambos casos $2n=32$. Los siguientes resultados de recuentos en *R. grex parnassiifolius*, realizados en plantas pirenaicas orientales, resultaron ser $n=8$ ó $2n=16$ (Löve & Solbrig, 1964; Küpfer & Favarger, 1967; Favarger & Küpfer, 1968). Posteriormente Küpfer (1974), aportó abundantes datos de conteos de cromosomas, tanto $n=8$ ó $2n=16$, como $n=16$ ó $2n=32$, realizados en plantas de *R. grex parnassiifolius* procedentes de la mayor parte de su área de distribución; tal información se completó con los datos aportados por otros autores (Löve, 1987; Hüber, 1988; Diosdado, 1991; Diosdado & Pastor, 1991; Bueno Sánchez *et al.*, 1992; Baltisberger, 1992) (tab. 1).

El tratamiento sistemático para *Ranunculus* grex *parnassiifolius* en la mayoría de las floras

actuales (Cook *et al.*, 1986; Jalas & Suominen, 1989; Tutin & Akeroyd, 1993) fue propuesto por Küpfer (1974). En tal tratamiento, en el que junto a los criterios morfológicos se tienen en cuenta los citológicos y ecológicos, se distinguen cuatro subespecies: *R. parnassiifolius* subsp. *parnassiifolius*, diploide ($2n=16$), silicícola, endémico de los Pirineos Orientales; *R. parnassiifolius* subsp. *cabrerensis* Rothm., diploide ($2n=16$), silicícola, endémico de las montañas del noroeste de España; *R. parnassiifolius* subsp. *favargerii* P.Küpfer, diploide ($2n=16$), calcícola, endémico de los Picos de Europa (Cordillera Cantábrica) y Pirineos Occidentales; y finalmente, *R. parnassiifolius* subsp. *heterocarpus* P.Küpfer, tetraploide ($2n=32, 40$), calcícola, extendido por la Cordillera Cantábrica, Pirineos Centrales y Alpes. Más tarde, Bueno Sánchez *et al.* (1992) describieron otra subespecie, *R. parnassiifolius* subsp. *muniellensis* Bueno, Fern.Casado & Fern.Prieto, diploide ($2n=16$), silicícola, con una sola población en la Reserva de la Biosfera de Muniellos (occidente de la Cordillera Cantábrica). En el extremo oriental del área de distribución de *Ranunculus parnassiifolius* s.l. (Macizo del Korab) crece *Ranunculus westteinii* Dörfler, una raza tetraploide ($2n=32$) (Baltisberger, 1992), cuya sistematización precisa revisión.

La aplicación de nuevas metodologías como la estimación de la cantidad de ADN nuclear mediante citometría de flujo nos ha permitido reconocer la existencia de poblaciones diploides y tetraploides en plantas de veinte poblaciones de *Ranunculus* grex *parnassiifolius* procedentes de toda su área de distribución (Cires *et al.*, 2009, 2010), que responden a un modelo de distribución geográfica coherente con respecto a los recuentos de cromosomas previamente realizados por otros autores. Además, el uso de marcadores moleculares apoyan una nueva propuesta sistemática que considera dos especies independientes en el grupo: *R. cabrerensis* Rothm. (*R. parnassiifolius*

Referencia bibliográfica	Localidad	Dato
Löve & Solbrig (1964)	<i>R. parnassifolius</i> s.l. France, Pyrénées, Col de Fenestrelle (citado por Favarger & Huynh.).	n=8
Küpfer & Favarger (1967)	<i>R. parnassifolius</i> s.l. Pyrénées?	2n=16
Favarger & Küpfer (1968)	<i>R. parnassifolius</i> s.l. France, Pyrénées-Orientales, Camp del Paronas, 2500 m.	2n=16
	<i>R. parnassifolius</i> s.l. France, Pyrénées-Orientales, Col de Finestrelles, 2500 m.	2n=16
	<i>R. parnassifolius</i> s.l. Suisse, Valais, Ht. d'Arbignon, 2100 m.	2n=32
	<i>R. parnassifolius</i> s.l. Suisse, Grisons, au dessus du Col de l'Albula, 2650 m.	2n=32
Küpfer (1974)	<i>R. p.</i> subsp. <i>cabrerensis</i> . España, León, Sierra de Cabrera, SE du Lago de la Baña, versant SW du Picon, 1950 m.	2n=16
Küpfer (1974)	<i>R. p.</i> subsp. <i>cabrerensis</i> . España, Palencia, versant SE de Curavacas, 2050 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>cabrerensis</i> . España, Cantabria, S de San Glorio, Portillo Las Yeguas, 2010 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>parnassifolius</i> . France, Pyrénées-Orientales, Vallée de Llo, Col de Fenestrelles, 2300 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>parnassifolius</i> . France, Pyrénées-Orientales, Vallée d'Eyne, 2450 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>parnassifolius</i> . España, Gerona, versant NE du Puigmal, 2550 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>favargeri</i> . España, Cantabria, Picos de Europa, Peña Vieja, Collado de la Canalona, versant E., 2450 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . España, Cantabria, Picos de Europa, versant NNE de la Peña Vieja, 2200 m.	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . España, Cantabria, Picos de Europa, versant S de la Peña Vieja, éboulis d'Aguja, 1960 m.	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . France, Hautes-Pyrénées, W du Port de Boucharo, Soum des Espécières, 2500 m	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . España, Huesca, Puerto de Barrosa, crête E., 2560 m	2n=32, 40
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . España, Huesca, N Castanesa, versant S de la Sierra Negra, 2450 m.	2n=32, 40
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . Andorra, Pic de Casamanya, 2680 m.	2n=32, 40
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . France, Pyrénées-Orientales, Portaille d'Orlu, 2300 m.	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . Suisse, Valais, versant W du Grand Chavalard, 2100 m.	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . Suisse, Grisons, Albula, 2400 m.	2n=32
Vuille & Küpfer (1985)	<i>R. p.</i> subsp. <i>parnassifolius</i> . France, Pyrénées-Orientales, Puigmal, versant N-W, 2500 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>favargeri</i> . España, Huesca, Visaurin, versant S-W, 2200 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . España, Huesca, Puerto de Barrosa, crête E et S, 2450-2600 m.	2n=32, 40
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . España, Huesca, N Castanesa, versant S de la Sierra Negra, 2200 m.	2n=32, 40
Löve (1987)	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . Suisse, Valais, Grand-Chavalard, 2100 m.	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . Suisse, Lämmerendoden, 3 km NW of Leukerbad (citado por Baltisberger & Hüber).	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . Italia, Südtirol, Reiter Joch, 2240 m.	2n=32
Hüber (1988)	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . Italia, Südtirol, Reiter Joch, 2380 m.	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . Österreich, Osttirol, Zochen Pass, 2300 m.	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>parnassifolius</i> . España, Gerona, Santuario de Nuria, subida al Puigmal, 2400 m.	2n=16
Diosdado (1991)	<i>R. p.</i> subsp. <i>cabrerensis</i> . España, León, Abelgas, Pico Peñouta, 2000 m.	2n=16
Diosdado & Pastor (1991)	<i>R. p.</i> subsp. <i>cabrerensis</i> . España, León, El Morredero, 2000 m.	2n=16
	<i>R. p.</i> subsp. <i>heterocarpus</i> . España, Huesca, Parque Nacional de Ordesa, Faja Pelay, 1700 m.	2n=32
	<i>R. p.</i> subsp. <i>muniellensis</i> . España, Asturias, Ibias, Reserva Natural Integral de Muniellos, Peña-velosa, 1450 m.	2n=16
Bueno Sánchez <i>et al.</i> (1992)	<i>R. p.</i> subsp. <i>muniellensis</i> . España, Asturias, Ibias, Reserva Natural Integral de Muniellos, Peña-velosa, 1450 m.	2n=16
	<i>R. parnassifolius</i> . Albania. -W- bis SW-exponierte Schutthalde, Cüseli, N-Teil des Kula Ziberit; 2250 m.	2n=32
Baltisberger (1992)	<i>R. westtseimi</i> . Albania. -W- bis SW-exponierte Schutthalde, Cüseli, N-Teil des Kula Ziberit; 2250 m.	2n=32

Tabla 1. Números cromosómicos conocidos en plantas de *Ranunculus parnassifolius* s.l. de diversas localidades del conjunto de su área de distribución. *Chromosome numbers known in plants of Ranunculus parnassifolius* s.l. from different localities throughout its distribution area.

Identificador: pliego y etiqueta de herbario

- 1: JBAG-Laínz 2788-1: "Peña de Curavacas, in glareosis meridionalibus"(vidimus et alibi), 1900 m, (1196), ES
 - 2: JBAG-Laínz 2790-1: "San Emiliano; supra Riolago, pr. summum Alto de la Cañada", 1800 m, (1989), ES
 - 3: JBAG-Laínz 1105-1: "Cabrales; Picos de Europa, loco Torca Sierra dicto (in ditione ovetensi)", 1700 m, non rarus in glareosis calcareis (1969), ES
 - 4: JBAG-Laínz 1106-1: "Cillorigo de Liébana; Picos de Europa: Valdominguero, Ándara" 2000 m, rochers (1923), ES
 - 5: JBAG-Laínz 1109-1: "Camaleño; infra verticem La Padiorna dictum (Picos de Europa), ditione santanderiensi", 2250 m, loco glareoso (1975), ES
 - 6: JBAG-Laínz 1110-1: "Somiedo; Picos Albos (Saliencia)", 1800 m, in rupestribus calcareis (1973), ES
 - 7: JBAG-Laínz 1111-1: "Cillorigo de Liébana; pr. Ándara (Picos de Europa, in ditione santanderiensi, orientali)" 1850 m, (1975), ES
 - 8: JABG 2576-1: "Senda de las Traviesas, Ándara, Cillórigo de Liébana, Cantabria, paredón calizo", 1888 m, (2007), ES
 - 9: JBAG-Laínz 2792-1: "Cerdagne, Vallée d'Eyne, éboulis schisteux", 2400 m, (1915), FR
 - 10: FCO-24678: "Cerler: subida al Pico Gallinero", 2375 m, (1996), ES
 - 11: Herbar Schuster: "Catalogne: Montagne de Nuria près du col de Llo", 2550 m, (1910), ES
 - 12: Herbarium Eduar Martin Reineck: "Hautes Pyrénées- Gèdre par Luz", (1890), FR
 - 13: JBAG-Laínz 1112-1: "am alten Weg von Crap Alv zum Albula-Hospiz, Kalk-Schutthalden, 2200 m, (1954), CH
 - 14: Herbar Hermann: ex Alpibus plantae. Botanicum Bouchar "Lacunae montium. Wester montis: Méry", 2200 m, FR
 - 15: Herbarium Normale: editum ab I. Dörfler 4441 "Gallia. Haute-Savoie. In cacumine montis Meiry prope Brizon", 2470 m, (1896, 1897), FR
-

Tabla 2. Ejemplares de *Ranunculus parnassiiifolius* s.l. examinados procedentes de diferentes herbarios. ES: España; FR: Francia; CH: Suiza. *Specimens of Ranunculus parnassiiifolius* s.l. examined from different herbaria. ES: Spain; FR: France; CH: Switzerland.

subsp. *cabrerensis* y *R. parnassiiifolius* subsp. *muniiellensis*) y *R. parnassiiifolius* L. (*R. parnassiiifolius* subsp. *parnassiiifolius*, *R. parnassiiifolius* subsp. *favargerii* y *R. parnassiiifolius* subsp. *heterocarpus*) (Cires, 2011; Cires & Fernández Prieto, 2011). De acuerdo con este tratamiento sistemático, *R. parnassiiifolius* subsp. *parnassiiifolius* es un raza distribuida exclusivamente en los Pirineos incluyendo tanto plantas diploides como tetraploides y, excepcionalmente, pentaploides. En el mismo sentido, *R. parnassiiifolius* subsp. *favargerii* incluye plantas calcícolas, tanto diploides como tetraploides, de la Cordillera Cantábrica. Por último *R. parnassiiifolius* subsp. *heterocarpus* se entiende como una raza

exclusiva de los Alpes que incluye solamente plantas tetraploides.

La alta esterilidad polínica en las plantas poliploides (mayoritariamente tetraploides) de *Ranunculus* grex *parnassiiifolius* fue postulada por Küpfer (1974) y Vuille & Küpfer (1985), y considerada como una evidencia de la existencia de procesos reproductivos parcialmente apomícticos (reproducción asexual por medio de semillas). Otros autores pusieron de manifiesto tales procesos en plantas poliploides en el género *Ranunculus* tanto en el complejo *R. auricomus* (Hörandl *et al.*, 2009) como en el complejo *R. kuepferi* (Burnier *et al.*, 2009; Cosendai & Hörandl, 2010).

Este trabajo pretende, en primer lugar,

ABE	<i>Ranunculus cabrerensis</i> subsp. <i>cabrerensis</i> : Abelgas de Luna, al norte de Peña Piquera, 1956 m (Sena de Luna, León, España).
ABP	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>heterocarpus</i> : Albulapass, Blais Cuorta, 2507 m (Graubünden, Suiza).
ALB	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>favargeri</i> : Macizo de los Picos Albos, Lago Cerveriz, 1946 m (Somiedo, Asturias, España).
AMP	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>heterocarpus</i> : Detrás del Refugio de Auronzo, Tre Cime di Lavaredo, 2353 m (Trentino-Alto Adige, Belluno, Italia).
ARL	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>parnassiiifolius</i> : Col d'Arlas, 1971 m (Aquitaine, Francia).
BAÑ	<i>Ranunculus cabrerensis</i> subsp. <i>cabrerensis</i> : Lago de la Baña, Sierra Cabrera, 2000 m (Encinedo, León, España).
BOC	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>favargeri</i> : Jou de los Boches, Macizo Central de los Picos de Europa, 2136 m (Cabrales, Asturias, España).
CAD	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>parnassiiifolius</i> : Alto de Puigllançada, Parque Natural Cadí-Moixeró, 2165 m (Bagà, Barcelona, España).
CAN	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>favargeri</i> : Collado de la Canalona, Central de los Picos de Europa, 2455 m (Camaleño, Cantabria, España).
CAR	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>favargeri</i> : Collado de San Carlos, Macizo Oriental de los Picos de Europa, 2050 m (Camaleño, Cantabria, España).
CHI	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>parnassiiifolius</i> : Final de la pista de Chisagües, sur de Sierra de Liena, 2346 m (Bielsa, Huesca, España).
EIX	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>parnassiiifolius</i> : Coll de la Creu de l'Eixol, 2246 m (Espot, Lérida, España).
FON	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>parnassiiifolius</i> : Collada de Fontalba, 2223 m (Querallbs, Gerona, España).
GCH	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>heterocarpus</i> : Grand Chavalard, vertiente oeste, 2071 m (Valais, Suiza).
GRA	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>favargeri</i> : Canal de las Grajas, Macizo Oriental de los Picos de Europa, 1688 m (Camaleño, Cantabria, España).
MOL	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>favargeri</i> : Los Moledizos, Macizo Occidental de los Picos de Europa, 2043 m (Posada de Valdeón, León, España).
MUN	<i>Ranunculus cabrerensis</i> subsp. <i>muniiellensis</i> : Peña Velosa, Valdebueyes, Reserva de Biosfera de Muniellos, 1442 m (Cangas del Narcea, Asturias, España).
PAN	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>favargeri</i> : Camino desde Pandébano a la Vega de Urriellu, Macizo Central de los Picos de Europa, 1632 m (Cabrales, Asturias, España).
URR	<i>Ranunculus parnassiiifolius</i> subsp. <i>favargeri</i> : Vega de Urriellu, camino hacia Horcados Rojos, Macizo Central de los Picos de Europa, 1967 m (Cabrales, Asturias, España).
YEG	<i>Ranunculus cabrerensis</i> subsp. <i>cabrerensis</i> : Portillo de las Yeguas, 2094 m (Vega de Liébana, Cantabria, España).

Tabla 3. Acrónimos y origen de las 20 poblaciones estudiadas mediante citometría de flujo en *Ranunculus parnassiiifolius* s.l. (Cires *et al.*, 2009, 2010). *Acronyms and origin of the 20 populations studied by flow cytometry in Ranunculus parnassiiifolius* s.l. (Cires *et al.*, 2009, 2010).

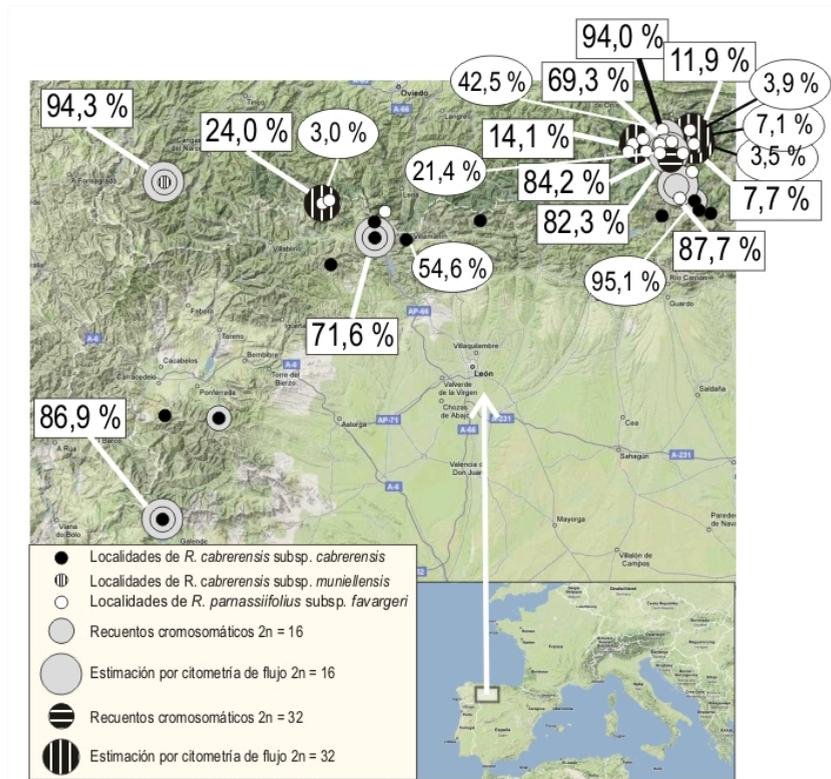


Figura 1. Porcentajes de polen bien formado y distribución de localidades de *Ranunculus grex parnassifolius* en la Cordillera Cantábrica. Porcentajes encerrados en rectángulos: datos de muestras de poblaciones con estimación de ploidía mediante citometría de flujo; porcentajes encerrados en óvalos: datos de muestras de pliegos de herbario. *Well-formed pollen percentages and localities distribution of Ranunculus grex parnassifolius in the Cantabrian Mountains. Percentages enclosed in rectangles: data from population samples with ploidy level estimation by flow cytometry; percentages enclosed in ovals: data from herbarium specimens.*

demostrar la existencia de una elevada esterilidad polínica evidenciada por una alta malformación polínica en plantas tetraploides. En segundo lugar, analizar la distribución geográfica de las muestras con alta y baja fertilidad y su coherencia con la distribución de las razas reconocidas en *Ranunculus grex parnassifolius*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El polen se obtuvo de ejemplares de *Ranunculus grex parnassifolius* depositados

en los herbarios FCO, JBAG y JBAG-Láinz (tab. 2) y de materiales correspondientes a muestras de las poblaciones cuya cantidad de ADN fue estimada mediante citometría de flujo (Cires *et al.*, 2009, 2010) (tab. 3). El polen se extrajo de varias anteras de distintas flores de una misma planta. El polen fue limpiado y deshidratado en el portaobjetos por adición de alcohol etílico de 70° y 96°. Posteriormente, el polen fue montado siguiendo la técnica de Wodehouse (1935), usando como colorante azul de metileno. La preparación fue cubierta con un cubre objetos y examinada mediante un

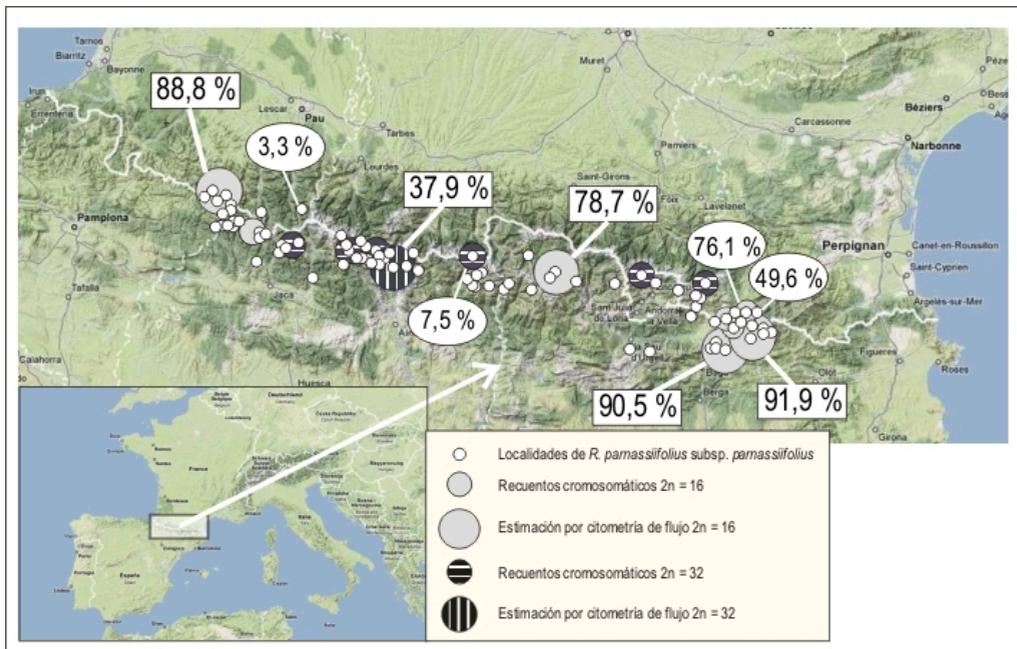


Figura 2. Porcentajes de polen bien formado y distribución de localidades de *Ranunculus grex parnassiiifolius* en los Pirineos. Porcentajes encerrados en rectángulos: datos de muestras de poblaciones con estimación de ploídía mediante citometría de flujo; porcentajes encerrados en óvalos: datos de muestras de pliegos de herbario. *Well-formed pollen percentages and localities distribution of Ranunculus grex parnassiiifolius in the Pyrenees. Percentages enclosed in rectangles: data from population samples with ploidy level estimation by flow cytometry, percentages enclosed in ovals: data from herbarium specimens.*

microscopio binocular. Cuando fue posible, se observaron aproximadamente 500 granos de polen por muestra, anotándose el número de granos de polen bien formados y malformados, y se calcularon los porcentajes correspondientes a ambos tipos.

RESULTADOS

Los resultados, expresados tanto en valores absolutos como en porcentajes de granos de polen bien formado y mal formado en cada muestra, se presentan en las tablas 4, 5 y 6, correspondiendo a la Cordillera Cantábrica, los Pirineos y los Alpes, respectivamente. Tales resultados se presentan de forma gráfica en las

figuras 1, 2 y 3.

Todas las muestras de *Ranunculus cabrerensis* subsp. *cabrerensis*, taxon diploide ($2n = 16$) según recuentos cromosómicos y de citometría de flujo, evidenciaron porcentajes de polen bien formado por encima del 50%; con una única muestra con valores algo inferiores (Identificador número 2), que sin embargo en otra muestra del mismo ejemplar mostró valores superiores. Las muestras analizadas de la única población conocida de *R. cabrerensis* subsp. *muniiellensis*, que mediante recuentos cromosómicos y citometría de flujo se ha establecido que es diploide ($2n = 16$) (tab. 4, fig. 1), mostraron valores similares o incluso claramente más altos.

En lo que se refiere a las poblaciones

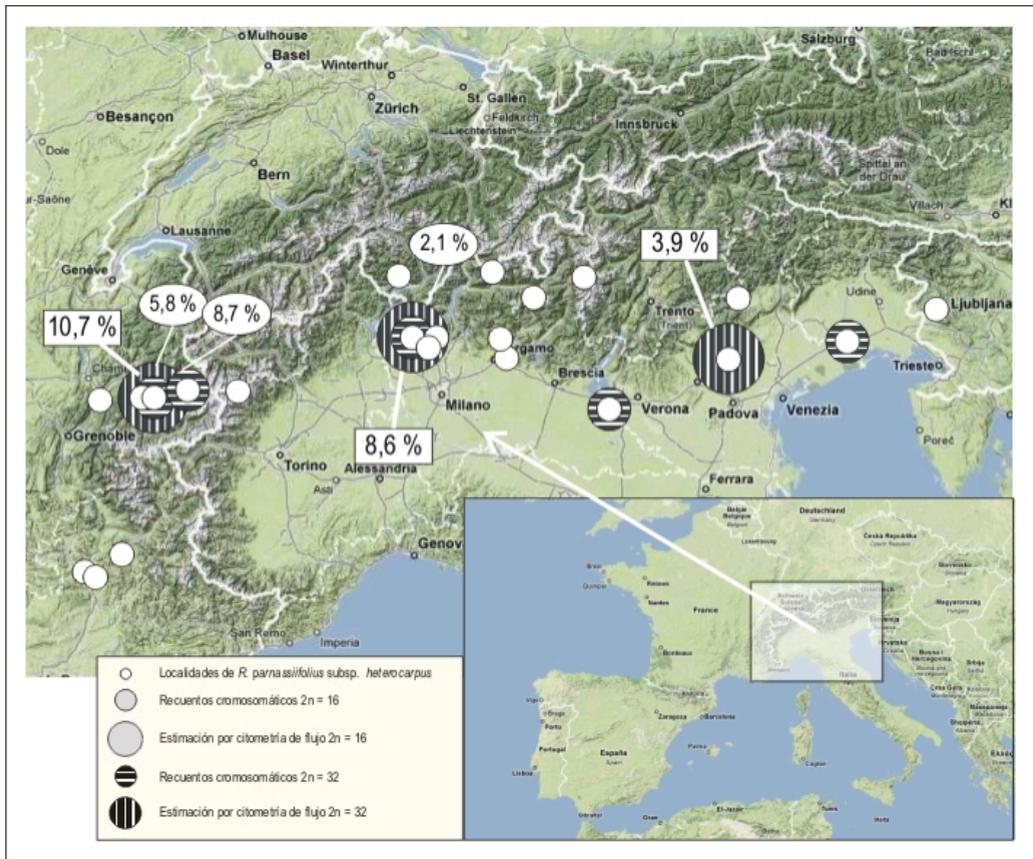


Figura 3. Porcentajes de polen bien formado y distribución de localidades de *Ranunculus grex parnassifolius* en los Alpes. Porcentajes encerrados en rectángulos: datos de muestras de poblaciones con estimación de ploidía mediante citometría de flujo; porcentajes encerrados en óvalos: datos de muestras de pliegos de herbario. *Well-formed pollen percentages and localities distribution of Ranunculus grex parnassifolius in the Alps. Percentages enclosed in rectangles: data from population samples with ploidy level estimation by flow cytometry; percentages enclosed in ovals: data from herbarium specimens.*

calcícolas de la Cordillera Cantábrica sistematizadas como *R. parnassifolius* subsp. *favargerii*, tanto los recuentos cromosómicos como la citometría de flujo han evidenciado la existencia de poblaciones diploides ($2n = 16$) y tetraploides ($2n = 32$). En el Macizo Central de los Picos de Europa únicamente se conocen poblaciones diploides, mientras que las poblaciones tetraploides son raras en estas montañas y, por los datos disponibles, exclusivas de los Macizos Oriental y Occidental de los Picos de Europa y de otras montañas

calcícolas como los Picos Albos (Somiedo). Los resultados de los análisis polínicos mostraron que en las poblaciones diploides los porcentajes de polen bien formado fueron superiores al 65%, salvo en una muestra de las 6 analizadas del Collado de la Canalona (CAN); en el caso de la Vega de Urriellu (URR), una muestra presentó valores excepcionalmente bajos, mientras que los valores en otras flores del mismo individuo fueron normales. Las muestras de las poblaciones tetraploides evidenciaron porcentajes de polen bien formado

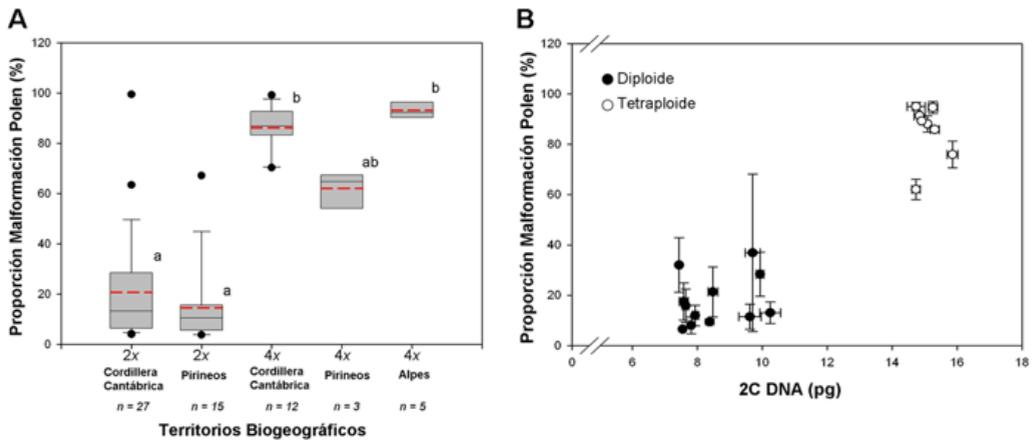


Figura 4. Malformación polínica en los citotipos diploides y tetraploides de *Ranunculus grex parnassifolius* según: (A) los territorios biogeográficos y (B) la estimación de contenido de ADN nuclear (2C DNA). *Pollen malformation in diploid and tetraploid cytotypes of Ranunculus grex parnassifolius depending on: (A) biogeographical territories and (B) the estimation of nuclear DNA content (2C DNA)*. En la representación gráfica de cajas, las líneas horizontales representan la mediana, mientras que la envergadura de las cajas representa el rango intercuartil, y los bigotes marcan los límites inferior y superior de valores no atípicos. Los círculos representan los valores atípicos. Las medias con diferencias no significativas con un p -valor ≤ 0.001 , se indican con la misma letra (pruebas estadísticas de Kruskal Wallis y Test Dunn).

por debajo de 30% y, normalmente por debajo de 20% (tab. 4, fig. 1).

En las poblaciones pirenaicas, sistematizadas como *R. parnassifolius* subsp. *parnassifolius*, tanto los recuentos cromosómicos como la citometría de flujo revelaron la existencia de plantas diploides ($2n = 16$) y tetraploides ($2n = 32$), estas últimas fundamentalmente en la zona central de la cordillera. En las muestras de las poblaciones diploides el porcentaje de polen bien formado fue superior o muy próximo al 70%, salvo en una muestra de las seis analizadas procedente del Coll de la Creu de l'Eixol (EIX). En las muestras analizadas de la única población tetraploide estudiada, Chisagües (CHI), el porcentaje de polen bien formado, fue inferior al 50%, mientras que en las muestras analizadas procedentes de pliegos de herbario de la zona central pirenaica (Identificador número 10 y 12, tab. 5 y fig. 2) el porcentaje obtenido fue muy bajo (inferior al 18%).

En los Alpes, tal como se desprende de los recuentos cromosómicos realizados y de los

análisis de citometría de flujo, sólo se conocen poblaciones de plantas tetraploides ($2n = 32$) que se sistematizan como *R. parnassifolius* subsp. *heterocarpus*. En las tres poblaciones en las que se dispone de información de la cantidad de ADN, los porcentajes de polen bien formado son inferiores al 15% y aún resultan más bajos los porcentajes resultantes de muestras de pliegos de herbario de tal procedencia (tab. 6 y fig. 3).

Finalmente, se presenta la relación entre la malformación polínica de los distintos citotipos (diploide, tetraploide) de *R. grex parnassifolius*, respecto a su distribución por los territorios biogeográficos (fig. 4A), así como con la estimación de contenido de ADN nuclear (2C DNA) (fig. 4B).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Desde los primeros estudios citogenéticos realizados por Langlet (1927, 1932) y

Acrónimo / Identificador	Nivel ploidía	Bien formado		Malformado		Total
		Número	%	Número	%	
<i>Ranunculus cabrerensis</i> subsp. <i>cabrerensis</i>						
ABE	2n	500	86,80	76	13,19	576
		508	56,51	391	43,49	899
		513	71,55	204	28,45	717
BAÑ	2n	500	91,24	48	8,75	548
		500	82,64	105	17,35	605
YEG	2n	235	93,25	17	6,74	252
		1009	75,19	333	24,81	1342
		510	94,79	28	5,20	538
1	–	505	95,10	26	4,60	531
2	–	507	68,51	233	31,49	740
		345	40,78	501	59,22	846
<i>Ranunculus cabrerensis</i> subsp. <i>muniiellensis</i>						
MUN	2n	500	95,23	25	4,76	525
		500	93,45	35	6,54	535
<i>Ranunculus parmassifolius</i> subsp. <i>favargerii</i>						
ALB	4n	206	28,97	505	71,02	711
		79	13,41	510	86,58	589
		214	29,72	506	70,28	720
BOC	2n	500	95,96	21	4,03	521
		503	83,41	100	16,58	603
		504	73,15	185	26,85	689
CAN	2n	355	65,74	185	34,25	540
		1001	53,93	855	46,06	1856
		502	89,80	57	9,49	559
		501	93,99	32	6,00	533
		500	95,78	22	4,21	522
CAR	4n	508	94,77	28	5,22	536
		104	17,22	500	82,78	604
		35	6,11	538	93,89	573
GRA	4n	74	12,46	520	87,54	594
		46	8,39	502	91,61	548
		5	0,81	616	99,19	621
MOL	4n	39	6,98	520	93,02	559
		107	15,44	586	84,56	693
		95	14,31	569	85,69	664
PAN	2n	69	12,71	474	87,29	543
		416	93,48	29	6,51	445
		509	95,14	26	6,54	535
URR	2n	505	93,52	35	6,48	540
		469	85,12	82	14,88	551
		467	36,63	808	63,37	1275
3	–	441	76,17	138	23,83	579
		500	79,11	132	20,88	632
		45	7,65	543	92,34	588
		67	11,81	500	88,18	567
		326	64,55	179	35,44	505
4	–	469	70,84	193	29,15	662
		332	57,83	242	42,16	574
5	–	23	7,09	301	92,90	324
6	–	49	21,39	180	78,60	229
7	–	7	3,00	226	96,99	233
8	–	12	3,90	295	96,09	307
8	–	18	3,47	500	96,52	518

Tabla 4. Malformación del polen en muestras procedentes de la Cordillera Cantábrica. Acrónimo e identificador de las muestras de acuerdo con las tablas 2 y 3. Nivel de ploidía estimado de acuerdo con Cires *et al.* (2009, 2010). Tratamiento sistemático de las muestras según Cires (2011) y Cires & Fernández Prieto (2011). *Pollen malformation in samples from the Cantabrian Mountains. Acronym and identifier of samples in accordance with tables 2 and 3. Ploidy level estimated in accordance with Cires et al. (2009, 2010). Systematic treatment of the samples according to Cires (2011) and Cires & Fernández Prieto (2011).*

Acrónimo / Identificador	Nivel ploidía	Bien formado		Malformado		Total
		Número	%	Número	%	
<i>Ranunculus parnassifolius</i> subsp. <i>parnassifolius</i>						
ARL	2n	511	83,49	101	16,50	612
		502	86,40	79	15,59	581
		508	96,21	20	3,78	528
CAD	2n	500	89,28	60	10,71	560
		500	92,76	39	7,23	539
		523	89,55	61	10,44	584
CHI	4n	179	35,30	328	64,69	507
		129	45,90	152	54,09	281
		242	32,61	500	67,38	742
		522	94,22	32	5,77	554
		342	33,20	688	66,80	1030
EIX	2n	500	95,05	26	4,94	526
		549	91,04	54	8,95	603
		500	69,93	215	30,06	715
		508	88,81	64	11,18	572
		451	85,25	78	14,74	529
FON	2n	504	94,38	30	5,59	534
		515	96,08	21	3,91	536
9	-	524	50,14	521	49,85	1045
		527	48,98	549	51,02	1076
		4	0,78	504	99,21	508
10	-	23	3,81	580	96,18	603
		109	17,86	501	82,13	610
11	-	35	76,08	12	26,08	46
12	-	3	3,33	87	96,66	90

Tabla 5. Malformación del polen en muestras procedentes de los Pirineos. Acrónimo e identificador de las muestras de acuerdo con las Tablas 2 y 3. Nivel de ploidía estimado de acuerdo con Cires *et al.* (2009, 2010). Tratamiento sistemático de las muestras según Cires (2011) y Cires & Fernández Prieto (2011). *Pollen malformation in samples from the Pyrenees. Acronym and identifier of samples in accordance with Tables 2 and 3. Ploidy level estimated in accordance with Cires et al. (2009, 2010). Systematic treatment of the samples according to Cires (2011) and Cires & Fernández Prieto (2011).*

Acrónimo / Identificador	Nivel ploidía	Bien formado		Malformado		Total
		Número	%	Número	%	
<i>Ranunculus parnassifolius</i> subsp. <i>heterocarpus</i>						
ABP	4n	17	8,62	180	91,37	197
		10	1,66	591	98,34	601
AMP	4n	39	5,17	705	93,50	754
		26	4,91	503	98,34	529
GCH	4n	10	10,75	83	89,24	93
13	-	11	2,11	509	97,88	520
14	-	22	5,78	358	94,21	380
15	-	48	8,75	500	91,24	548

Tabla 6. Malformación del polen en muestras procedentes de los Alpes. Acrónimo e identificador de las muestras de acuerdo con las tablas 2 y 3. Nivel de ploidía estimado de acuerdo con Cires *et al.* (2009, 2010). Tratamiento sistemático de las muestras según Cires (2011) y Cires & Fernández Prieto (2011). *Pollen malformation in samples from the Alps. Acronym and identifier of samples in accordance with tables 2 and 3. Ploidy level estimated in accordance with Cires et al. (2009, 2010). Systematic treatment of the samples according to Cires (2011) and Cires & Fernández Prieto (2011).*

Gregory (1941), basados en el tamaño de los cromosomas y cambios en el número básico, la familia Ranunculaceae ha sufrido importantes reorganizaciones sistemáticas. Tales caracteres cariológicos han permitido distinguir en la familia Ranunculaceae dos grandes grupos: el grupo *Ranunculus*, también llamado el grupo de los R-cromosomas, caracterizado por tener cromosomas grandes y largos y número básico igual a 8 y que incluye, entre otros, los géneros *Anemone*, *Ranunculus* y *Clematis*; y el grupo *Thalictrum*, o grupo de los T-cromosomas, con cromosomas pequeños y cortos, con números básicos que varían entre 7, 9 ó 13, y que integra géneros tales como *Thalictrum*, *Hydrastis* y *Aquilegia*. Dichos caracteres resultan ser de los más congruentes cuando se han realizado filogenias de la familia Ranunculaceae basados en datos moleculares (Ro *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2009).

Durante la última década, el empleo conjunto de la estimación de la cantidad de ADN nuclear mediante citometría de flujo junto con la malformación polínica en complejos poliploides de plantas, han servido de apoyo a la hora de realizar sugerencias taxonómicas (Zonneveld & Van Iren, 2001). Tal información sobre el tamaño del genoma en plantas, así como la malformación polínica de las mismas, proporciona una guía práctica para establecer prioridades de conservación en grupos complejos, y nos permite desarrollar estrategias para mantener una mayor diversidad genética. En el caso concreto de *Ranunculus grex parnassifolius*, una alta esterilidad del polen en las plantas poliploides (en su mayoría tetraploides) fue citada por Küpfer (1974) y Vuille & Küpfer (1985), y se considera como una prueba de la existencia de procesos reproductivos parcialmente apomícticos.

El presente estudio ha permitido confirmar la baja viabilidad de polen en las poblaciones tetraploides (85,27% de polen no viable) en comparación con las poblaciones diploides (17,72%) determinadas mediante citometría

de flujo, y por lo tanto inferir niveles de ploidía para aquellas muestras procedentes de herbarios. Nuestros resultados, al igual que los mostrados por Küpfer (1974) y Vuille & Küpfer (1985), demuestran una alta esterilidad polínica en las plantas tetraploides de *R. parnassifolius*. Sin embargo, y en contra de lo expuesto por Küpfer (1974) donde indicaba un modelo altitudinal en las poblaciones de Picos de Europa con la presencia del citotipo tetraploide a altitudes más bajas, nuestros datos no apoyan tal modelo de distribución altitudinal entre los citotipos diploides y tetraploides. Por otro lado, hemos encontrado un patrón de distribución espacial dentro de los Picos de Europa, donde el citotipo diploide se localiza en el Macizo Central de los Picos de Europa mientras que el citotipo tetraploide aparecería en el resto de macizos (occidental y oriental) y en la Cordillera Cantábrica. Finalmente, quisiéramos destacar que el grado de malformación del polen nos permite asegurar que el tipo de *R. parnassifolius* es pirenaico y no alpino como en un principio indicaba Küpfer (1974), y que posteriormente este mismo autor atribuyó al este de los Pirineos.

BIBLIOGRAFÍA

- BALTISBERGER, M. -1992- Botanische Notizen und zytologische Untersuchungen an einigen Pflanzen (insbesondere aus den Gattungen *Ranunculus* und *Achillea*) aus dem albanisch-jugoslawischen Grenzgebiet (Korab, Sar Planina). *Ber. Geobot. Inst. ETH Stiftung Rubel* 58: 192-211.
- BUENO S NCHEZ, A., M.A. FERN NDEZ CASADO y J.A. FERN NDEZ PRIETO -1992- A new subspecies of *Ranunculus parnassifolius* L. (Ranunculaceae) from the Cantabrian Mountains, Spain. *Bot. J. Linn. Soc.* 109: 359-367.
- BURNIER, J., S. BUERKI, N. ARRIGO, P. KÜPFER y N. ALVAREZ -2009- Genetic structure and evolution of Alpine polyploidy complexes: *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae) as a case

- study. *Mol. Ecol.* 18: 3730-3744.
- CIRES, E. -2011- Unravelling the polyploid complex *Ranunculus parnassifolius* L. (Ranunculaceae): A combined morphologic and molecular-genetic approach. Memoria de Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo.
- CIRES, E., C. CUESTA, E.L. PEREDO, M.A. REVILLA y J.A. FERNÁNDEZ PRIETO -2009- Genome size variation and morphological differentiation within *Ranunculus parnassifolius* group (Ranunculaceae) from calcareous screes in the Northwest of Spain. *Plant Syst.Evol.* 281: 193-208.
- CIRES, E., C. CUESTA, M.A. REVILLA y J.A. FERNÁNDEZ PRIETO -2010- Intraspecific genome size variation and morphological differentiation of *Ranunculus parnassifolius* (Ranunculaceae), an Alpine-Pyrenean-Cantabrian polyploid group. *Biol. J. Linn. Soc.* 101: 251-271.
- CIRES, E. y J.A. FERNÁNDEZ PRIETO -2011- The Iberian endemic species *Ranunculus cabrerensis* Rothm.: an intricate history in the *Ranunculus parnassifolius* L. polyploid complex. *Plant Syst.Evol.* DOI: 10.1007/s00606-011-0529-9.
- COOK, C.D.K., J. GRAU y G. LÓPEZ GONZÁLEZ -1986- *Ranunculus* L. Sect. *Ranuncella* (Spach) Freyn., in S. Castroviejo *et al.* (eds.). *Flora Iberica. Vol. 1. Lycopodiaceae-Papaveraceae*. Págs.: 279-371. Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Madrid.
- COSENDAI, A.-C. y E. HÖRANDL -2010- Cytotype stability, facultative apomixis and geographical parthenogenesis in *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). *Ann. Bot.* 105: 457-470.
- DIOSDADO, J.C. -1991- *Estudio cariológico del género Ranunculus L. en la Península Ibérica*. Memoria de Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- DIOSDADO, J.C. y J.E. PASTOR -1991- Observaciones cariológicas en el género *Ranunculus* L. sect. *Ranuncella* (Spach) Freyn en la Península Ibérica. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.* 125: 879-894.
- FAVARGER, C. y P. KÜPFER -1968- Contribution à la cytotaxonomie de la flore alpine des Pyrénées. *Collect. Bot. (Barcelona)* 7: 325-357.
- GREGORY, W.C. -1941- Phylogenetic and cytological studies in the Ranunculaceae Juss. *Trans. Am. Philos. Soc.* 31: 443-521.
- HÖRANDL, E. -2009- Geographical parthenogenesis: opportunities for asexuality, in: I. Schoen, K. Martens y P. Van Dijk (eds.). *Lost sex*. Págs.: 161-186. Springer, Heidelberg.
- HÖRANDL, E., J. GREILHUBER, K. KLIMOVA, O. PAUN, E. TEMSCH, K. EMADZADE y I. HODÁLOVÁ -2009- Reticulate evolution and taxonomic concepts in the *Ranunculus auricomus* complex (Ranunculaceae): insights from morphological, karyological and molecular data. *Taxon* 58: 1194-1215.
- HÖRANDL, E., O. PAUN, J.T. JOHANSSON, C. LEHNEBACH, T. ARMSTRONG, L. CHEN y P. LOCKHART -2005- Phylogenetic relationships and evolutionary traits in *Ranunculus* s.l. (Ranunculaceae) inferred from ITS sequence analysis. *Mol. Phylogenet Evol.* 36: 305-327.
- HÜBER, W. -1988- Natürliche Bastardierungen zwischen weissblühenden *Ranunculus*-Arten in den Alpen. *Veröff. Geobot. Inst. ETH Stiftung Rübel Zürich* 100: 1-160.
- JALAS, J. y J. SUOMINEN (eds.) -1989- *Atlas Florae Europaeae. Distribution of vascular plants in Europe. 8. Nymphaeaceae to Ranunculaceae*. Págs.: 204-207. The Committee for Mapping the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica Vanamo, Helsinki.
- KÜPFER, P. -1974- Reserches sur les liens de parenté entre la flore orophile des Alpes et celle des Pyrénées. *Boissiera* 23: 1-322.
- KÜPFER, P. y C. FAVARGER -1967- Premières prospections caryologiques dans la flore orophile des Pyrénées et de la Sierra Nevada. *Compt.-Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 264: 2463-2465.
- LANGLET, O. -1927- Beiträge zur zytologie der Ranunculazeen. *Sven. Bot. Tidskr.* 21: 1-17.
- LANGLET, O. -1932- Über chromosomenverhältnisse und systematik der Ranunculaceae. *Sven. Bot. Tidskr.* 26: 381-400.
- LANGLET, O. -1936- Nagra bidrag till kändedomen om kromosomtalen inom Nymphaeaceae, Ranunculaceae, Polemoniaceae och Compositae. *Sven. Bot. Tidskr.* 30: 288-294.
- LÖVE, A. -1987- Chromosome number reports XCVI. *Taxon* 36(3): 659-661.
- LÖVE, A. y O.T. SOLBRIG -1964- IOPB chromosome number reports II. *Taxon* 13: 201-209.

- RO, K., C.S. KEENER y B.A. MCPHERON -1997- Molecular phylogenetic studies of the Ranunculaceae: utility of the nuclear 26S ribosomal DNA in inferring intrafamilial relationships. *Mol. Phylogenet Evol.* 8: 117-127.
- TAMURA, M. -1993- Ranunculaceae, in: K. Kubitzki, J.G. Rohwer y V. Bittrich (eds.). *The families and genera of vascular plants. 2. Flowering plants. Dicotyledons, Magnoliid, Hamamelid, and Caryophyllid families.* Págs.: 563-583. Springer, Berlin.
- TAMURA, M. -1995- Angiospermae. Ordnung Ranunculales. Fam. Ranunculaceae. II. Systematic Part., in: P. Hiepko (ed.). *Die natürliche Pflanzenfamilien*, ed. 2, 17aIV. Págs.: 223-519. Duncker & Humblot, Berlin.
- TISCHLER, G. -1950- *Die Chromosomenzahlen der Gefäßpflanzen Mitteleuropas.* W. Junk, s³-Gravenhage, The Netherlands.
- TUTIN, T.G. y J.R. AKEROYD -1993- *Ranunculus* L., in: T.G. Tutin *et al.* (eds.). *Flora Europaea. Vol. 1. Psilotaceae to Platanaceae*, ed. 2. Págs.: 269-286. Cambridge University Press, Cambridge.
- VUILLE, C. y P. KÜPFER -1985- Aposporie chez le *R. parnassifolius* L. I. Étude cytoembryologique. *Bull. Soc. Neuchatel. Sci. Nat.* 108: 123-134.
- WANG, W., A.-M. LU, Y. REN, M.E. ENDRESS y Z.-D. CHEN -2009- Phylogeny and classification of Ranunculales: evidence from four molecular loci and morphological data. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 11: 81-110.
- WODEHOUSE, R.P. -1935- *Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine.* McGraw-Hill, New York.
- ZIMAN, S.N. y C.S. KEENER -1989- A geographical analysis of the family Ranunculaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 76: 1012-1049.
- ZONNEVELD, B. y F. VAN IREN -2001- Genome size and pollen viability as taxonomic criteria: application to the genus *Hosta*. *Plant Biol.* 3: 176-185.