

**ESTUDIOS CITOGENÉTICOS Y EVOLUTIVOS EN ESPECIES
ESPAÑOLAS DE LA FAMILIA RESEDACEAE L. SECCION
GLAUcoresEDA D.C.**

por

JUAN J. GONZÁLEZ AGUILERA, ANTONIA M.^a FERNÁNDEZ PERALTA &
AMADEO SAÑUDO*

Resumen

GONZÁLEZ AGUILERA, J. J., A. M.^a FERNÁNDEZ PERALTA & A. SAÑUDO (1980). Estudios citogenéticos y evolutivos en especies españolas de la familia Resedaceae L. Sección Glaucoreseda DC. *Anales Jard. Bot. Madrid* 36: 311-320.

Se exponen los resultados del análisis del comportamiento de los cromosomas en meiosis, análisis cariotípico, fertilidad y tamaño de los granos de polen y análisis electroforético de proteínas totales en las especies de la sección *Glaucoreseda* D.C. del género *Reseda* L. Se discute el número cromosómico básico primitivo de esta sección así como la filogenia de las especies que la integran.

Abstract

GONZÁLEZ AGUILERA, J. J., A. M.^a FERNÁNDEZ PERALTA & A. SAÑUDO (1980). Cytogenetic and evolutive studies in the Spanish species of Resedaceae L. Section Glaucoreseda DC. *Anales Jard. Bot. Madrid* 36: 311-320 (In Spanish).

The results of the meiotic chromosome behaviour, karyotype analysis, fertility and size of the pollen grains and the electrophoretic behaviour of total proteins in the species of section *Glaucoreseda* D.C. of the Genus *Reseda* L. are studied. The original chromosome basic number of this section as well as the phylogeny of its species are discussed.

INTRODUCCIÓN

La sección *Glaucoreseda* D.C. es una de las más características del género *Reseda* L. en España, ya que todas las especies que la integran

(*) Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

—*R. glauca* L., *R. complicata* Bory, *R. virgata* Boiss. & Reuter y *R. gredensis* (Cutanda & Willk.) Müller Arg.— son endémicas de la Península Ibérica.

La distribución geográfica de estas especies se restringe casi exclusivamente a regiones montañosas. A excepción de *R. virgata*, que coloniza zonas de altitud media, el resto de las especies constituyen verdaderos aislados geográficos enclavados en la Cordillera Cantábrica y Pirineos (*R. glauca*), Sierra de Gredos (*R. gredensis*) y Sierra Nevada (*R. complicata*). Esta característica distribución geográfica parece haber condicionado la diferenciación de estos táxones.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la tabla 1 se resumen las poblaciones estudiadas, su localización geográfica, el número de referencia, así como los números gaméticos y somáticos correspondientes.

Para cada una de las especies se han recogido muestras al azar en distintas poblaciones naturales, analizándose un número variable de individuos en cada una de ellas de acuerdo con el tamaño de las mismas, de tal forma que la muestra fuera siempre significativa.

Las plantas herborizadas como testigos de las recolecciones se encuentran depositadas en el Herbario del Real Jardín Botánico de Madrid. La determinación taxonómica del material ha sido realizada por el doctor don Enrique Valdés-Bermejo.

TABLA 1

POBLACIONES Y NUMEROS CROMOSOMICOS DE LA SECT.
GLAUCORESEDA D.C.

ESPECIE	LOCALIDAD	N.º ref.	n	2n
<i>R. glauca</i> L.	Viella (Lérida)	R-156	14	—
	Aragües del Puerto (Huesca)	R-238	—	28
<i>R. complicata</i> Bory	S.ª Nevada (Granada)	R-185	14	—
	Pto. de la Ragua (Granada)	R-215	—	28
<i>R. virgata</i> Boiss. & Reuter	Cantoblanco (Madrid)	R-105	14	—
	El Tiemblo (Avila)	R-141	14	—
	Moluengo (Zamora)	R-178	—	28
<i>R. gredensis</i> (Cutanda & Willk.) Müller Arg.	S.ª Gredos (Avila)	R-216	—	28

Para el análisis del comportamiento meiótico se han utilizado las técnicas descritas por SAÑUDO (1971), modificadas ligeramente en algunos casos.

Para el estudio de las mitosis se utilizaron puntas de raíces obtenidas de la germinación de semillas. Los meristemas radicales se trataron en primer lugar con Colchicina 0,2 por 100 durante 15 minutos, y a continuación se pasaron a 8-oxiquinoleína 0,002 M, donde se mantuvieron durante 2 horas a temperatura ambiente. La fijación se hizo con Carnoy (3:1) durante 1 hora a 0-4° C y, tras la hidrólisis en ClH IN a 60° C, durante 3,5-4 minutos, fueron teñidos con orceína acética al 1 por 100 (20-30 minutos).

Para la descripción de los cariótipos se ha adoptado la terminología introducida por LEVAN & al. (1964).

La determinación de la fertilidad de los granos de polen se hizo utilizando yemas florales en una etapa avanzada de desarrollo, pero antes de producirse la antesis. Estas yemas se sumergieron en mezcla de Müntzing (SHARMA & SHARMA, 1972) compuesta por Glicerol y Carmín acético al 1 por 100 (3:1).

Los análisis electroforéticos de proteínas totales se han llevado a cabo en semillas sin germinar. Dichas semillas fueron trituradas hasta obtener un fino polvo, el cual se introdujo en un tubo de centrifuga al que se le añadió una cantidad de tampón extractor equivalente en peso al material estudiado. El tampón extractor utilizado fue una mezcla de SDS al 20 por 100, glicerol, bromophenol blue, DTT 1M y Tris/ClH, 1M, pH 6,8. Las muestras se mantuvieron en dicho tampón durante 12 horas a 0° C con el fin de solubilizar todas las proteínas contenidas en las semillas.

La electroforesis se ha realizado en gel vertical de poliacrilamida con SDS, para conseguir una distribución de las proteínas sobre el gel de acuerdo con su Pm. La técnica seguida para el desarrollo de la electroforesis ha sido la de WEBER & OSBORN (1969) modificada por LAEMMLI (1970).

RESULTADOS

Observaciones en meiosis

En la tabla 2 se resumen los datos obtenidos en el análisis del comportamiento meiótico de los táxones estudiados.

Entre las anomalías meióticas que se han observado merecen ser destacadas:

- 1.º La segregación precoz de los univalentes durante la M-I en *R. complicata* (R-185).
- 2.º Las asociaciones secundarias de varias parejas de cromosomas en *R. glauca* (R-156), lo que revela la existencia de homología estructural entre algunas de las parejas (Fig. 1).

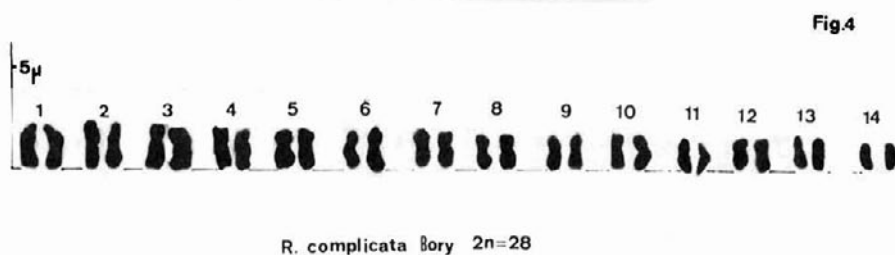
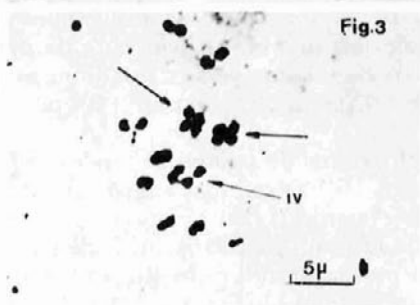
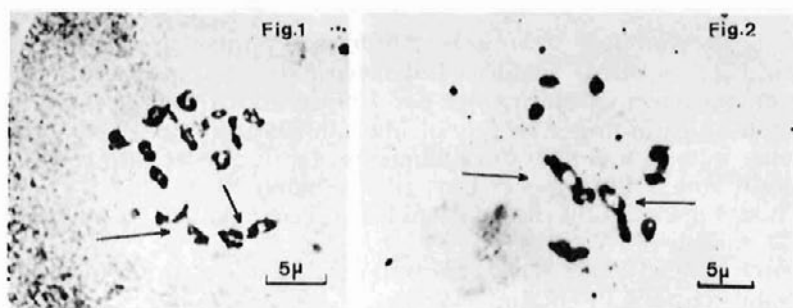


Fig.4

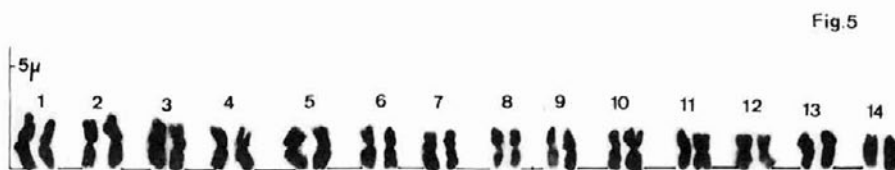


Fig.5

Fig. 1.—Asociaciones secundarias entre varias parejas de bivalentes en Metáfase I de *R. glauca* L. (R-156).

Fig. 2.—Configuraciones cromosómicas multivalentes en M-I de *R. complicata* Bory (R-185).

Fig. 3.—Configuración cromosómica tetravalente y asociaciones secundarias en M-I de *R. virgata* Boiss. & Reuter (R-105).

Fig. 4.—Cariótipo de *R. complicata* Bory ($2n = 28$).

Fig. 5.—Cariótipo de *R. virgata* Boiss. & Reuter ($2n = 28$).

TABLA 2
FRECUENCIA DE ANOMALIAS EN MEYOSIS

ESPECIE	N.º ref.	n	Diacinesis-metáfase I				Anáfase-Telófase I			Anáfase-Telóf. II		N.º células	Anomal. %	
			Normales	Config. polival.	Asocia. secund.	Segreg. precoc.	Normales	Segreg. irregu.	Otras	Normales	Micromic.			
R. glauca	R-156	14	71	—	9	—	11	16	—	1	20	—	128	16,40
R. complicata	R-185	14	42	8	12	2	6	6	6	—	45	2	129	27,90
R. virgata	R-105	14	101	19	3	—	2	14	1	—	24	—	164	15,24
	R-141	14	12	5	—	—	—	3	—	—	16	4	38	22,50

3.º La configuración cromosómica tetravalente observada durante la diacinesis en *R. complicata*. La frecuencia con que aparece este tetravalente es del 20 por 100. En esta misma fase se observa también una asociación secundaria en la que se ve implicado el bivalente que se asocia al nucléolo. Además durante la metafase I se observan placas con 14 II junto a otras con 12 II + 1 IV, 12 II + 1 III + 1 I y 10 II + 1 IV + 1 III + 1 I. La coincidencia del tetravalente y el trivalente en una misma célula se da con una frecuencia del 5,5 por 100 (Fig. 2).

En *R. virgata* también hemos observado una configuración cromosómica tetravalente con una frecuencia del 19,7 por 100 (Fig. 3).

4.º Los cromosomas retrasados y puentes cromosómicos observados durante la anáfase I en *R. virgata*.

5.º Los fenómenos de endopoliploidía observados en *R. complicata* y *R. virgata*, hecho que sugiere una posible vía evolutiva para estas plantas.

Fertilidad y tamaño de los granos de polen

Los datos obtenidos sobre fertilidad y tamaño de los granos de polen se recogen en la tabla 3.

La sección *Glaucoreseda*, considerada en conjunto, es la más fértil del género. Sin embargo, no siempre esta fertilidad se corresponde con un comportamiento meiótico regular. Así, *R. complicata*, con un 98,86 por 100 de granos de polen fértiles, muestra en metafase I diversas configuraciones cromosómicas multivalentes así como la segregación precoz de un bivalente. Una situación análoga se observa en *R. virgata*.

En cuanto al tamaño, merecen ser señaladas las diferencias encontradas en las distintas especies a pesar de su proximidad morfológica, encontrándose los tamaños máximo y mínimo en *R. glauca* y *R. virgata* respectivamente.

TABLA 3

TAMAÑO Y FERTILIDAD DE LOS GRANOS DE POLEN

ESPECIE	N.º ref.	n	Ferti- lidad %	DIAMETRO (µm)	
				Extremos	Medios
<i>R. glauca</i> L.	R-156	14	99,8	17,64 - 14,70	16,59 ± 0,17
<i>R. complicata</i> Bory	R-185	14	98,86	17,16 - 14,30	15,50 ± 0,17
<i>R. virgata</i> Boiss. & Reuter	R-105	14	98	14,70 - 11,76	13,17 ± 0,21
	R-141	14	96,92	14,70 - 11,76	12,94 ± 0,22

Observaciones en mitosis

Los cariótipos que describimos a continuación se estudian aquí todos por primera vez.

R. glauca L. $2n = 28$

Nuestro recuento, $2n = 28$, realizado en los individuos de la población de Aragües del Puerto (Huesca) coincide con los realizados anteriormente por OKSIJUK (1935) y EIGSTI (1936). Sin embargo, no hemos observado la variabilidad en el número que encuentra este último autor ($n = 10, 12$).

Hasta el momento no hemos podido elaborar el cariótipo de esta especie.

R. complicata Bory $2n = 28$ (Fig. 4)

EIGSTI (1936) de $2n = 28$ y $n = 15$ para material cultivado en distintos Jardines Botánicos Americanos. Nuestro recuento $2n = 28$, realizado en la población del Puerto de la Ragüa (Granada) y confirmado en meiosis ($n = 14$) en individuos de esta misma población, coincide con el de este autor. Sin embargo, al igual que en *R. glauca* no hemos observado la variabilidad en cuanto al número que EIGSTI (loc. cit.) indica para esta especie.

El tamaño cromosómico oscila entre 2,18 y 1,19 μm . El cariótipo comprende 10 parejas «m» (centrómero en la región mediana) la 2.^a, 3.^a, 5.^a, 6.^a, 7.^a, 8.^a, 9.^a, 10.^a, 11.^a y 12.^a y cuatro parejas «sm» (centrómero en región submediana) la 1.^a, 4.^a, 13.^a y 14.^a, siendo la 1.^a satelitífera.

R. virgata Boiss. & Reuter $2n = 28$ (Fig. 5)

EIGSTI (1936) encuentra $n = 14$ y $2n = 28$ en individuos de esta especie cultivados en el Jardín Botánico de Illinois. La población que hemos analizado en mitosis procedente de Moluengo (Zamora) presenta $2n = 28$, número que hemos podido confirmar en meiosis ($n = 14$) en las poblaciones de Cantoblanco (Madrid) y El Tiemblo (Avila).

El tamaño cromosómico oscila entre 2,49 y 1,73 μm . El cariótipo comprende 3 parejas «M» (8.^a, 10.^a, y 11.^a) y 11 «m», siendo satelitíferas la 1.^a y la 3.^a. Durante la profase meiótica hemos observado un solo bivalente asociado al nucléolo.

R. gredensis (Cutanda & Willk.) Müller Arg. $2n = 28$

No hemos encontrado citas en la bibliografía que reseñen el número cromosómico de esta especie, por lo que pensamos que el número $2n = 28$ encontrado en la población analizada procedente de la Sierra de Gredos (Avila) se da aquí por vez primera.

Hasta el momento no hemos podido elaborar el cariótipo de esta especie.

Análisis de proteínas totales

La finalidad perseguida al hacer este tipo de análisis electroforético, en el que las proteínas se distribuyen sobre el gel de acuerdo con su Pm, ha sido el poder determinar los patrones de bandas correspondientes a cada una de las especies, y sobre su base establecer las afinidades a nivel molecular entre las especies comparadas.

Mediante este análisis hemos comparado *R. glauca*, *R. virgata* y *R. complicata*, observándose que las bandas con un R_f - 0,72; 0,68; 0,60; 0,56; 0,52; 0,41; 0,38; 0,24 (Fig. 6) son comunes a las tres especies, si bien la banda 0,24 es mucho más intensa en *R. virgata*.

Las bandas 0,48 y 0,44 presentes en *R. complicata* y *R. virgata* con igual intensidad no aparecen, en cambio, en *R. glauca*.

La banda 0,28 aparece muy intensa en *R. complicata*, disminuyendo su intensidad en *R. virgata* y no apareciendo en *R. glauca*.

Por último la banda 0,18 es característica de *R. glauca*.

Como puede deducirse de estos resultados existe una gran proximidad a nivel de proteínas totales entre *R. complicata* y *R. virgata*, teniendo patrones de bandas muy similares, mientras que *R. glauca* diverge de las otras dos sobre todo en lo que se refiere a proteínas de Pm elevado y medio.

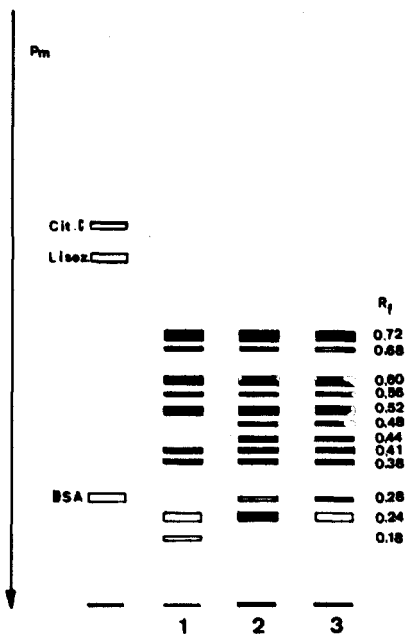


Figura. 6

DISCUSIÓN

En el estudio realizado por EIGSTI (1936) sobre las Resedaceas, se indica el número $n = 14$ como característico de las especies de la sección *Glaucoreseda*. Posteriormente no se ha realizado ningún estudio citológico sobre estas especies.

La variabilidad cromosómica encontrada por EIGSTI (loc. cit.) en alguna de estas especies y que nosotros no hemos logrado detectar, a pesar de muestrear extensivamente las poblaciones, la atribuimos al origen cultivado del material utilizado por el autor con las dificultades que entraña su determinación taxonómica, así como a los inevitables errores que muestran frecuentemente, en cuanto a determinación taxonómica, las semillas enviadas por los Jardines Botánicos.

De los resultados obtenidos de nuestros análisis deducimos que efectivamente el número $n = 14$ es el característico de las especies de esta sección. Sin embargo, no pensamos que éste sea el número básico de la sección *Glaucoreseda*. Efectivamente, estas especies presentan un número cromosómico alto que sugiere un origen poliploide, no conociéndose sus diploides ancestrales que incluso parecen haber desaparecido. Además las especies diploides de las secciones próximas son suficientemente diferentes como para que puedan ser consideradas ancestrales de dichos poliploides. Esta hipótesis encuentra un importante apoyo en la observación de configuraciones multivalentes y asociaciones secundarias durante la meiosis de estas especies, hechos que apuntan hacia un origen autopoliploide y un proceso de diploidización incompleto. Por otra parte son aislados geográficos, constituyendo cada uno de ellos lo que los taxónomos consideran buenas especies.

Estas características, expuestas anteriormente, nos permiten encuadrarlas dentro de los paleopoliploides esquizoendémicos (FAVARGER 1960, 1962) y nos inducen a pensar en el origen secundario del número $n = 14$ a expensas de ancestrales con $x = 7$ por procesos de tipo euploide, siendo por tanto este último el número básico de la sección.

Parece lógico pensar, dada la distribución geográfica de las Resedaceas, que la especie ancestral que colonizó nuestra península desde el continente africano debió experimentar cambios numéricos en los cromosomas por procesos de naturaleza euploide. Asimismo, se puede pensar que ante las condiciones adversas del medio (glaciaciones, etc.) quedaría aislada en sus «refugios» montañosos, hecho que suele ir acompañado de un proceso de deriva genética en poblaciones pequeñas y, por tanto, de diferenciación.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Dr. D. Enrique Valdés-Bermejo, del Real Jardín Botánico de Madrid, su inestimable ayuda en la localización, recolección y determinación de las plantas utilizadas en nuestro estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EIGSTI, O. J. (1936). Cytological Studies in the Resedaceae. *Bot. Gaz.* 98 (2): 363-369.
- FAVARGER, C. (1960). Sur l'emploi des nombres des chromosomes en Géographie Botanique Historique. *Ber. Geobot. Inst. ETH Stiftung Rübel* 32: 119-146.
- FAVARGER, C. & J. CONTRANDRIOPOULOS. (1962). Essai sur l'endémisme. *Bull. Soc. Bot. Suisse* 71: 384-408.
- GONZÁLEZ-AGUILERA, J. J. & M. RUIZ REJÓN (1976). In IOPB chromosome number reports LX, *Taxon* 27 (2/3): 223-231.
- GONZÁLEZ-AGUILERA, J. J., A. M.^a FERNÁNDEZ PERALTA & A. SAÑUDO (1979). Cytogenetic and Evolutive Studies on the Spanish Species of the Family Resedaceae L. Sections *Phyteuma* L. and *Resedastrum* Duby. *Bol. Soc. Broteriana*. (En prensa.)
- LAEMMLI, U. K. (1970). Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227: 680-682.
- LEVAN, A., K. FREDGA, & A. A. SANDBERS, (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Hereditas* 52: 201-220.
- OKSIJUK, P. (1935). Zur Cytologie und Embryologie der Resedaceen. *J. Bot. Just. Acad. Sci. Ukr.* 4: 15.
- SAÑUDO, A. (1970). Variabilidad cromosómica de las Genisteas de la Flora española en relación con su ecología. I. Número y comportamiento de los cromosomas durante la meiosis. A. Secciones *Erinacoides* Spach, *Scordioides* (L.) D. C. y *Asterospartum* Spach. del Género *Genista*. *Cuad. Ci. Biol.* 1: 1-21.
- SHARMA, A. K. & A. SHARMA. (1972). *Chromosome techniques. Theory and Practice*. Ed. Second. Butterworths. University Park-Press. London. Baltimore.
- STEBBINS, G. L. (1950). *Variation and Evolution in Plants*, Columbia University Press, New York.
- STEBBINS, G. L. (1971). *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Edward Arnold, London.
- WEBER, K. & M. ÖSBORN (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.

Aceptado para publicación: 20-XII-79