

Introducción

Phyllis es un género diploide (2n= 22), endémico de Macaronesia, constituido por dos especies, *P. nobla* (Madeira y Canarias) y *P. viscosa* (Canarias). Está enmarcado en la tribu Anthospermeae, subtribu Anthosperminae compuesta por los géneros *Anthospermum*, *Nenax*, *Galopina*, *Carpacoce* y *Phyllis*, distribuidos en África (Sur y Este), Madagascar y Macaronesia (Puff, 1982); esta subtribu se caracteriza por presentar especies polígamas, ginodioicas, subdioicas o dioicas, con flores hermafroditas protándricas, anemógamas y frutos secos (Puff, 1982, 1986; Anderson *et al.*, 2001). *Phyllis viscosa* está descrita como especie dioica y en *P. nobla* Mendoza-Heuer (1972) señala la presencia ocasional de flores femeninas.

Dentro del marco del proyecto Macflor2 (MAC2/4.6d/386), se han llevado a cabo estudios de biología reproductiva y micromorfología en *P. nobla*. Esta especie, que se sitúa bordeando la laurisilva, está presente en todas las islas excepto Lanzarote y Fuerteventura; se estudia una población de Gran Canaria donde su distribución es más restringida (Fig. 1).

Objetivo: evaluar las diferencias micromorfológicas entre los distintos tipos de flores observados (hermafroditas, femeninas e intermedias), número de granos de polen por antera y flor, número de óvulos, ratio Polen/Óvulo (flores hermafroditas), formación de semillas y tasa de germinación.

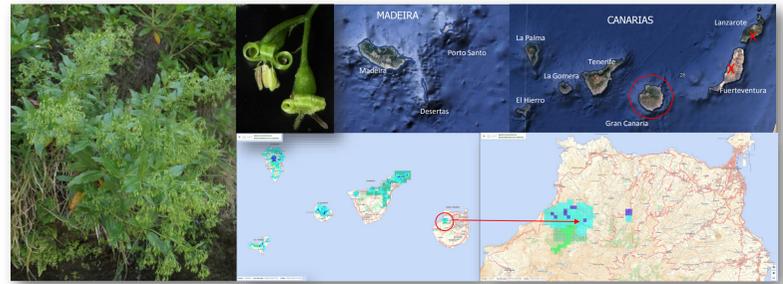
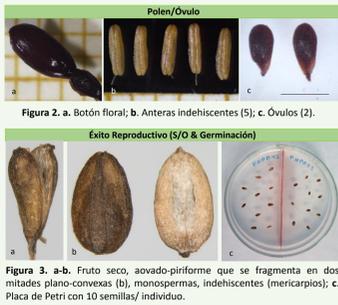


Figura 1. Distribución de *P. nobla*. En Canarias está presente en las islas occidentales (GC, T, G, P, H) y en el archipiélago de Madeira en las islas de Madeira, Porto Santo y Desertas (Mendoza-Heuer, 1972, BIOTA). Se ha seleccionado una población cercana a la Presa Los Pérez, incluida en la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria.

Phyllis nobla: planta vivaz, con ramas erectas; Hojas lanceoladas o ovado-lanceoladas, lampiñas o escasamente peludas; Inflorescencias compuestas, paniculadas, 8-30 cm o más; Flores la mayoría bisexuales (hermafroditas) y ocasional femenina, sin sépalos o muy reducidos, pétalos 4-5, de color verde pálido o blanquecino, 2-3 mm; Fruto seco, avoado o piriforme, 2,5-4 mm, lampiño, Semillas ovoides, algo aplastadas (Mendoza-Heuer, 1972). La población estudiada se sitúa en el NO de la isla (Presa de los Pérez, 900 m s. n. m.), incluida dentro de la Reserva de la Biosfera (Fig. 1).

Biología reproductiva

- Fenología floral:** la caracterización de los estados preliminares del desarrollo floral se ha realizado a partir de las observaciones e imágenes obtenidas en las poblaciones naturales y en el laboratorio.
- Sistemas de cruzamiento:** la relación Polen/Óvulo (Cruden, 1977) se utiliza como medida indirecta del sistema de cruzamiento. Para el recuento del número de granos de polen/antera se ha montado 1 antera/flor-botón (2 bot/ind); el conteo del nº de granos de polen/antera se realiza contabilizando todos los granos de cada antera mediante escaneado de la preparación en un microscopio óptico con platina motorizada (Nikon Eclipse-ProScanIII) y recuento automático de los mismos utilizando el software NIS-Elements BR 4.00. El número de óvulos por flor (3/ind) se obtiene diseccionando los ovarios en un estereoscopio (Fig. 2). El número de granos de polen/flor se calcula multiplicando este valor por el número de estambres de cada flor y la ratio P/O dividiendo por el total de óvulos de cada flor.
- Éxito reproductivo:** ratio Semilla/Óvulo y tasas de germinación de semillas, evaluados por individuos (Fig. 3). Las pruebas de germinación se llevaron a cabo en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo (T=21°C; Luz/Oscuridad=16/8) utilizando 10 semillas/individuo (120 semillas).



Micromorfología

- El análisis micromorfológico se ha centrado en los caracteres reproductivos: flores y semillas. Las flores se diseccionan en un estereoscopio (lupa) y los verticilos florales (corola, androceo y gineceo), colocados sobre papel milimetrado, se fotografan con una cámara digital acoplada a la lupa. Con las semillas se procede de manera similar pero se captan las imágenes del mericarpo indehisciente, dada la dificultad para extraer la semilla. Asimismo se realizan observaciones de polen y estigmas en el microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM6380LV).
- Se han analizado 31 caracteres (Fig.1, Tabla 1), 28 para la flor (corola-3; androceo-15, incluyendo caracteres del polen y recursos del androceo; gineceo-9) y 3 caracteres para las semillas.
- Las biometrías se han realizado con el software NIS-Elements BR 5.10. Los descriptivos estadísticos de cada carácter se calculan con el XLSTAT y se comparan los distintos caracteres entre tipos de flores con el test no paramétrico Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).
- Se analizan las diferencias entre flores hermafroditas (en fase σ y φ) y flores femeninas (F1). Dado el bajo número de flores femeninas tipo F2 e intermedias, estas no se incluyen en los análisis de K-W.

Carácter	Descripción	Unidad
FL D	Diámetro de la flor (desde la antera con lóbulos corolinos anillados hacia afuera)	mm
Pétal_L	Longitud del pétalo (medido pétalo 1-5)	mm
Pétal_A	Ancho del pétalo (medido pétalo 1-5)	mm
Pétal_M_Area	Área del pétalo (medido pétalo 1-5)	mm²
Nº Estb	Número de estambres (5)	-
Estb_L	Longitud del filamento (Estb-5)	mm
Estb_A	Longitud de la antera (Estb-5)	mm
Ant_Ind_L	Longitud de la antera indehiscente bot P/O (Ant1-5)	mm
Ant_Ind_A	Ancho de la antera indehiscente bot P/O (Ant1-5)	mm
Nº Grs /Ant	Número de granos de polen por antera	-
Area P	Área del grano de polen	µm²
P	Diámetro mínimo (Miferet)	µm
E	Relación Eje polar/ Eje ecuatorial	-
P/E	Relación del diámetro ecuatorial al Eje ecuatorial	-
Polen (MEB)	Relación Eje polar/ Eje ecuatorial	-
Ad	Ancho del mesocolpo a nivel ecuatorial	µm
Ova_L	Longitud del ovario	mm
Ova_A	Ancho del ovario	mm
Est_L	Longitud del estilo	mm
Est_A	Longitud del estigma (Est-2)	mm
Est_L	Ancho del estigma (Est-2)	mm
Nº Ovas	Número de óvulos (en general 2)	-
Ova_L	Longitud del óvulo (ova1 y ova2)	mm
Ova_A	Ancho máximo del óvulo (ova1 y ova2)	mm
Ova_M_Area	Área del ancho máximo del óvulo (ova1 y ova2)	mm²
Sem_Area	Área del mericarpo	mm²
Sem_Eje_P	Eje polar	mm
Sem_Eje_E	Eje ecuatorial	mm

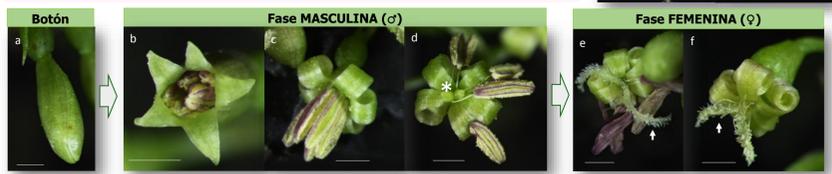
Tabla 1. Biometrías flor y semillas. Caracteres evaluados

Resultados y Discusión

Fenología floral

La protandria en las flores hermafroditas de *P. nobla* ya fue denunciada por Mendoza-Heuer (1972) y Puff (1982). La disposición péndula de las flores permite la dispersión del polen por el viento.

- Se describen tres estados preliminares:
 - E0. Botón:** Pétalos unidos, sin orificio (a)
 - E1. Fase σ :** los pétalos se separan (b) y rápidamente se enrollan hacia afuera dejando asomar las anteras unidas pero ya dehiscentes (c), se dispersa el polen y asoma el estigma todavía inmaduro (d*)
 - E2. Fase φ :** con anteras casi vacías (e) o ya caídas (f) y crecimiento de los estigmas hasta alcanzar la madurez (e-f).



La protandria no evita la auto-polinización, **geitonogamia** es posible ya que las flores en ambas fases coexisten en la misma inflorescencia.

Ratio Polen/Óvulo

En la Tabla 4 se detalla el número de granos por antera y flor, y ratio Polen/ Óvulo por flor. El número de estambres (5) y óvulos (2) es constante.

Ind.	Botón	Nº Grs /Ant	Nº Grs /Flor	P/O
PNP11	b1	7.297	36.485	18.242
	b2	6.921	34.605	17.303
PNP22	b1	7.552	37.760	18.880
	b2	8.068	40.340	20.170
PNP33	b1	6.572	32.860	16.430
	b2	4.056	20.280	10.140
PNP55	b1	5.958	29.790	14.895
	b2	5.926	29.630	14.815
PNP66	b1	7.549	37.745	18.872
	b2	7.872	39.360	19.680
Promedio	PNP	6.777	33.886	16.943

- Número medio de granos de **Polen/Antera** es de **6.777** (4.056-8.068)
- Número de granos de **Polen/Flor** = **33.886**, con un rango entre 20.280 y 40.340.
- La relación **Polen/Óvulo** = **16.943** (10.140-20.170) indica **xenogamia obligada** (XO), de acuerdo con el índice de Cruden (1977).
- Ratio P/O alto confirma la polinización por el viento.

Polen P/O	N	X ± E ₉₅ (min-max)
Área	4980	540,2 ± 1,2 (300,6-924,8)
P Eje polar	4980	29,7 ± 0,4 (23,2-40)
E Eje ecuatorial	4980	24,9 ± 0,04 (17,34-6)
P/E	4980	1,19 ± 0,001 (1,03-1,57)

Tabla 5. Biometrías del polen obtenidas de las preparaciones de P/O en el MO.

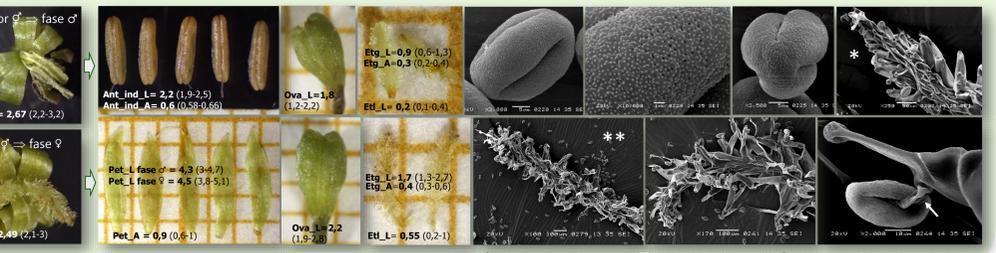
Micromorfología

Se caracterizan cuatro tipos de flores: hermafrodita, femenina-F1, femenina-F2 e intermedia. Se comparan las biometrías de los caracteres analizados entre flores hermafroditas (en fase σ y φ) y flores femeninas-F1 (Tabla 2); las flores femeninas F2 e intermedias, poco frecuentes, no se incluyen en los análisis. Las biometrías de las semillas se muestran en el apartado de éxito reproductivo (Tabla 6).

Tipo Fl	N	PÉTALOS			ANDROCEO			GINECEO	
H-fase σ	24	D	Pét_L	Pét_A	Est_L	Est_A	Est_L	Est_A	
Hermafrodita	24	2,67 ± 0,05 (2,28-3,15)	4,26 ± 0,08 (3,02-4,77)	0,9 ± 0,02 (0,62-1,0)	1,81 ± 0,05 (1,49-2,18)	2,2 ± 0,02 (1,9-2,6)	0,6 ± 0,01 (0,5-0,7)	0,93 ± 0,04 (0,85-0,91)	
H-fase φ	25	2,49 ± 0,04 (2,14-2,97)	4,52 ± 0,06 (3,86-5,11)	0,92 ± 0,01 (0,84-1,02)	1,98 ± 0,09 (1,55-2,92)	no	no	0,21 ± 0,05 (0,18-0,25)	
Femenina F1	6	1,63 ± 0,04 (1,53-1,81)	1,72 ± 0,05 (1,52-1,9)	0,45 ± 0,01 (0,4-0,49)	no	no	no	2,17 ± 0,10 (1,8-2,46)	

Tabla 2. Biometrías corola, androceo y gineceo. Comparación flores hermafroditas y femeninas-F1. Negrita: diferencias significativas

i) Hermafrodita, protándrica, con diámetro flor \approx 2,5 mm y pétalos de 4-4,5 mm; en fase masculina anteras con mucho polen, ovario y estigma poco desarrollado (<1mm); en fase femenina, estambres con restos de anteras o sin anteras, crecimiento del ovario y estigmas exortos bien desarrollados (\approx 1,7mm).



La observación del polen y los estigmas en el MEB permite distinguir la morfología del polen y el diferente desarrollo de las papilas estigmáticas en la fase σ (*) y en la fase φ (**), donde se observa el polen emitiendo tubo polínico (flecha).

ii) Femenina (F1) más pequeña que la flor hermafrodita, se distingue por el diámetro (1,6 mm) y pétalos de menor tamaño (1,7 mm) y estigmas más largos (\approx 3mm) y anchos. Se observa en inflorescencias exclusivamente φ .



Observación de estigmas en el MEB, no se aprecian las diferencias de ancho con los estgs de la flor hermafrodita. En ambos tipos de flores se observan granos de polen emitiendo tubo polínico (flecha).

iii) Femeninas (F2) muy pequeñas con pétalos < 1mm y estigmas medianos; ocasionales en individuos hermafroditas.

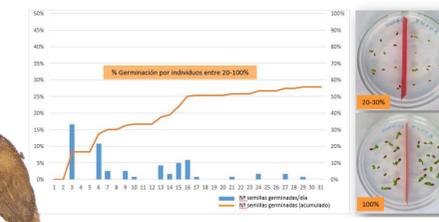


iv) Intermedias (I), funcionalmente femeninas. Variables en longitud de pétalos, presentan estigmas desarrollados y anteras de diferentes tamaños, pero sin polen o indehiscentes.

BIOMETRÍAS SEMILLAS

- Los mericarpos miden 3,9 mm (2,8-5) de longitud y 2,1 mm (1,6-2,8) de ancho y presentan una forma avoada.
- El test Kruskal-Wallis entre individuos es significativo para todos los caracteres biométricos de las semillas, pero los distintos grupos se solapan, no pudiendo establecer las diferencias claras entre individuos.

Biometrías Semillas (mm)				
Nº Inds	Nº Sem	Área (mm²)	Sem_Eje_P	Sem_Eje_E
12	120	6,4 ± 0,1 (3,7-10)	3,9 ± 0,4 (2,8-5)	2,1 ± 0,02 (1,6-2,8)
Kruskal-Wallis (p)		< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*



% germinación por individuos entre 20-100%

Éxito Reproductivo

- Ratio **Semilla/Óvulo=1**, todos los frutos forman 2 semillas (total 120 frutos, 10 Frs/ individuo de diferentes zonas de la infrutescencia).

TASAS DE GERMINACIÓN

- Se obtiene un porcentaje de germinación = **56%**, variable según individuos oscilando entre el 20 y el 100% (7 inds: <40%; 1 ind: 60%; 3 inds: 100%).
- No ha sido posible hacer corresponder los % de germinación con los tipos de individuos o flores. Es necesario, en futuros estudios, hacer la identificación previa de las flores de las que se recolectan las semillas.

Conclusiones

- Se caracterizan cuatro tipos de flores: i) Hermafrodita, ii) Femenina (F1); iii) Femeninas pequeñas, ocasionales y iv) Intermedias.
- Las flores hermafroditas presentan protandria acusada.
- En la población analizada se observan dos tipos de individuos que se diferencian en la tipo y proporción de flores femeninas:
 - La mayoría de las flores hermafroditas (σ) y ocasionalmente con flores femeninas (F2) y/o intermedias.
 - Con dos tipos de inflorescencias, unas solo con flores hermafroditas (σ) y otras solo con flores φ .
- La relación Polen/Óvulo = 16.943 indica xenogamia obligada (XO), de acuerdo con el índice de Cruden (1977). La disposición de las flores y la cantidad de polen por flor confirma la polinización por el viento.
- La tasa de germinación alcanza el 56% pero es variable según individuos oscilando entre el 20% y 100%.
- La presencia de distintos tipos de flores e individuos y las tasas de germinación variable indican la necesidad de analizar mayor número de individuos y poblaciones para valorar la incidencia del sistema sexual en el éxito reproductivo de *P. nobla*, especie hermafrodita en evolución hacia la **ginomonoecia**, posible etapa previa hacia la ginodioecia y dioecia presente en *P. viscosa*.

ACESES GONZÁLEZ, J.R., M.C. LEÓN ARENCIBIA, M. L. RODRÍGUEZ NAVARRO, M. DEL ARCO AGUIAR, A. GARCÍA GALLU, F. L. PÉREZ DE PAZ, O. RODRÍGUEZ DELGADO, V. E. MARTÍN OSORIO & WOLFFRED WILDFRET DE LA TORRE (2010). PTERIDOPHYTES, SPERMATOPHYTES. En: *Lista de especies silvestres de Canarias. Hongos, plantas y animales terrestres. 2009*. Arceva, M., S. Rodríguez, N. Zurita & A. García (coord.), Gobierno de Canarias, p. 115-172.

ANDERSON, C. L., J. H. E. ROVA & L. ANDERSON. 2001. Molecular phylogeny of the tribe Anthospermeae (Rubiaceae): Systematic and biogeographic implications. *Austr. Syst. Bot.* 14: 231-244.

BIOTA. 2023. Banco de datos de Biodiversidad de Canarias <https://www.biodiversidadcanarias.es/biota/especie/> F01089

CRUDEN, R. W. (1977). 1977. Pollen-Ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.

JACQUÉ, R. & H. MORALES DE SEQUEIRA (2008). Lista das plantas vasculares (Pteridofitas y Spermátfitas). In: Borges, P.A.V., Abreu, C., Aguiar, A.M.F., Carvalho, P., Jardim, R., Melo, I., Oliveira, P., Sérgio, C., Serrano, A.R.M. & Vieira, P. (eds.). *A list of the terrestrial fungi, flora and fauna of Madeira and Selvagens archipelagos*. pp.180-208. Direcção Regional do Ambiente da Madeira and Universidade dos Açores, Funchal and Angra do Heroísmo.

LEUCONA NEUMANN, R. M., LA-SERRA RANOS, I.E & B. MENDES PÉREZ. 1985. Estudio paleontológico del género *Phyllis* L. en Canarias. *An. Asoc. Paleont. Leng. Esp.* 2: 127-34.

MENDOZA-HEUER, I. 1972. Datos para la determinación de especies en el género *Phyllis* (Rubiaceae). *Guadalupe Botánica Canaria* 10(20): 5-9.

PUFF, C. 1982. The definition of the tribe Anthospermeae and its affinities to the Paederaceae (Rubiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 84: 355-377.

PUFF, C. 1986. A biogeographical study of the African and Madagascan Rubiaceae-Anthospermeae. *Pl. Syst. Evol. Supplementum* 1: 1-535.