

# Caracterización morfológica de *Phyllanthus* ×*pallidus* (*Phyllanthaceae*) y sus posibles parentales en Cajálbana, Pinar del Río, Cuba

## Morphological characterization of *Phyllanthus* ×*pallidus* (*Phyllanthaceae*) and its potential parents in Cajálbana, Pinar del Río, Cuba

Alicia Castañeda Correa<sup>1</sup>  y Banessa Falcón Hidalgo<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana, Carretera El Rocío km 3½, Calabazar, Boyeros, La Habana, Cuba, C.P. 19230. \*Autor para correspondencia (e-mail: [banessa@fbio.uh.cu](mailto:banessa@fbio.uh.cu)).

### RESUMEN

*Phyllanthus* ×*pallidus*, de parentales *P. discolor* y *P. comptus*, es el único híbrido dentro del género *Phyllanthus* registrado para Cuba. Estudios anteriores en el híbrido no fueron concluyentes en la morfología macroscópica y la viabilidad del polen, además, otros investigadores asumieron a *P. orbicularis* y *P. discolor* como los parentales del híbrido. El presente estudio tuvo como objetivo comparar caracteres morfológicos de las especies arbustivas de *Phyllanthus* en la Sierra de Cajálbana, para corroborar el origen de *P. ×pallidus* y sus posibles parentales. Se realizaron recolectas en Cajálbana de *P. discolor* y *P. ×pallidus*, y se tomaron los datos previamente publicados en Cajálbana de *P. orbicularis*. En el caso de *P. comptus* solo se trabajó con material de herbario puesto que no fue encontrado en el campo en el momento de muestreo. Se realizaron comparaciones cualitativas y cuantitativas entre los diferentes taxones en cuanto a caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos. Se analizó la viabilidad del polen en los diferentes taxones. Se encontraron anomalías morfológicas en las flores del híbrido y el polen en todos los taxones analizados presentó un alto porcentaje de viabilidad. Los resultados obtenidos probaron que *P. ×pallidus* es similar vegetativamente a *P. orbicularis* y reproductivamente a *P. discolor* lo que pudiera confirmar que *P. ×pallidus* es un híbrido y que sus parentales más probables son *P. orbicularis* y *P. discolor*.

**Palabras clave:** Elípticos de Fourier, introgresión, morfometría geométrica, ramificación filantoidea, vigor híbrido

### ABSTRACT

*Phyllanthus* ×*pallidus*, of parentals *P. discolor* and *P. comptus*, is the only hybrid within the genus *Phyllanthus* registered for Cuba. Prior studies in the hybrid were not conclusive in the macroscopic morphology and the pollen viability, in addition to the fact that other researchers assumed *P. orbicularis* and *P. discolor* as the parents of the hybrid. The present study aimed to compare the morphological characters of the shrub species of *Phyllanthus* in the Sierra de Cajálbana, to corroborate the origin of *P. ×pallidus* and its possible parents. Collections were made in Cajálbana of *P. discolor* and *P. ×pallidus* and the data previously published in Cajálbana of *P. orbicularis* were taken. In the case of *P. comptus*, only herbarium material was used since it could not be found in the field at sampling time. Qualitative and quantitative comparisons between the different taxa in terms of vegetative and reproductive morphological characters were made. The pollen viability in the different taxa was analyzed. Morphological anomalies were found in the flowers of the hybrid and the pollen in every analyzed taxa presented a high percentage of viability. The results obtained proved that *P. ×pallidus* is vegetatively similar to *P. orbicularis* and reproductively to *P. discolor*, which could confirm that *P. ×pallidus* is a hybrid and that its most probable parents are *P. orbicularis* and *P. discolor*.

**Keywords:** Fourier elliptical, introgression, geometric morphometry, filantoid branching, hybrid vigor

**Citación:** Castañeda, A. & Falcón, B. 2020. Caracterización morfológica de *Phyllanthus* ×*pallidus* (*Phyllanthaceae*) y sus posibles parentales en Cajálbana, Pinar del Río, Cuba. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana* 41: 147-161.

**Recibido:** 30 de julio de 2020. **Aceptado:** 24 de septiembre de 2020. **Publicado en línea:** 28 de diciembre de 2020. **Editor encargado:** Luis M. Leyva.

### INTRODUCCIÓN

La hibridación natural es un evento común entre plantas y animales (Grant 1989, Rieseberg 1997) que se caracteriza por el cruzamiento entre distintos genotipos, mayormente identificado entre especies del mismo género (Grant 1989, Rieseberg & Carney 1998). Sin embargo, este no es un fenómeno frecuente en las plantas del género *Phyllanthus* L., en el que hasta la actualidad solo se han descrito cuatro híbridos naturales (IPNI 2019). Uno de estos híbridos es *Phyllanthus* ×*pallidus* (C. Wright ex Griseb.) G.L. Webster, que es endémico de los cuabales de Cajálbana, La Palma, Pinar del Río, Cuba (Webster 1956-1958).

*Phyllanthus pallidus* C. Wright ex Griseb. fue descrito por Grisebach (1865) como una especie, no como un híbrido, quien

lo diferenció de su pariente más cercano, *P. discolor* Spreng., por la presencia de hojas glaucas, más gruesas y de un mayor número de estambres. Posteriormente, Müller (1866) propuso que *P. pallidus* presentaba además las hojas con venación poco evidente y flores femeninas con lóbulos del perigonio iguales y pedicelos más cortos que los de *P. discolor*. Webster (1956-1958) demostró que estos caracteres no fueron estables ni diagnósticos para diferenciar a *P. pallidus* de *P. discolor* y realizó un análisis morfológico que involucró caracteres como: la forma y anatomía de la hoja, la fertilidad de la semilla y la viabilidad del polen. Con los resultados obtenidos este autor concluyó que *P. pallidus* es un híbrido natural originado a partir del posible cruzamiento de *P. discolor* y *P. comptus* G.L. Webster, especies endémicas de Cuba y que cohabitan también en Cajálbana.

La decisión de Webster (1956-1958) de asumir a *Phyllanthus comptus* como el otro parental de *P. x pallidus* fue la semejanza morfológica encontrada entre *P. comptus* y *P. discolor*. Además, comentó que los catafilos, las hojas, los estilos y las semillas de *P. comptus* son muy diferentes de las de *P. discolor*, por lo que sugirió que cada especie debe representar el producto final de una larga línea evolutiva por separado. No obstante, a pesar de que este investigador validó este nototaxón, sus resultados no fueron concluyentes en la morfología macroscópica y la viabilidad del polen, ni estuvieron soportados por análisis estadísticos. Por otra parte, para Webster (1956-1958) resultó raro la ausencia de colecciones intermedias entre *P. x pallidus* y la especie parental *P. comptus*, lo que explicó (al menos en parte), por la aparente rareza de esta última en Cajálbana, ya que se había recolectado sólo tres veces hasta el año 1954.

Posteriormente, Berazain & al. (2007) asumieron a *Phyllanthus orbicularis* Kunth y *P. discolor* como los parentales de *P. x pallidus*. Estos investigadores arribaron a esta conclusión debido a la presencia de características morfológicas intermedias de ambas especies en *P. x pallidus* y a que la hiperacumulación de Ni en tejidos foliares del híbrido fue similar pero superior a la que encontraron en *P. discolor* y *P. orbicularis*. La hipótesis de que *P. orbicularis* sea el otro posible parental del híbrido, en conjunto con *P. discolor*, también fue analizada por Webster (1956-1958). Según este autor, en Cajálbana, *P. orbicularis* está presente cerca de casi todas las áreas que ocupa la población de *P. discolor* y muestra una afinidad lo suficientemente evidente como para que el cruce entre estas dos especies sea posible.

Al tener en cuenta la amplia distribución de *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis*, así como la poca presencia de *P. comptus* en Cajálbana, la evidencia de caracteres morfológicos intermedios de *P. orbicularis* y *P. discolor* en

*P. x pallidus* y la ausencia de estos entre *P. x pallidus* y *P. comptus*, la presente investigación tiene como objetivo: comparar caracteres morfológicos de las especies arbustivas de *Phyllanthus* en la Sierra de Cajálbana, para corroborar el origen de *P. x pallidus* y sus posibles parentales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se realizaron recolectas de ramas y flores de 15 individuos, de cuatro subpoblaciones de *Phyllanthus x pallidus* y de la población de *P. discolor* en la Reserva Florística Manejada Sierra "Preluda-Cuabales de Cajálbana", La Palma, Pinar del Río. De cada conjunto se depositó un ejemplar testigo en el herbario HAJB. En el caso de *P. comptus* se trabajó con los cinco materiales de herbario pertenecientes a tres recolecciones (se asumió cada material como un individuo), depositados en DAV y HAC, puesto que no fue encontrado en el momento del muestreo (Tabla I; acrónimos de los herbarios citados según Thiers [2020+]). De *P. orbicularis* se tomaron los datos obtenidos por Falcón & al. (2018) de la población de Cajálbana (Tabla I), correspondientes a 10 individuos. Las flores fueron conservadas en solución de alcohol al 70 % (3/4) y glicerol (1/4).

De cada individuo se evaluó el hábito, tipo de ramificación y tamaño. Se midió la longitud de cinco ramas y se contó el número de hojas por ramas medidas. Se analizaron 10 hojas por cada individuo, según: disposición, longitud del pecíolo, de la lámina: largo, ancho, relación largo/ancho, forma de la lámina, tipo de ápice, base, margen, contorno y análisis morfométrico del contorno de la lámina. Las características de forma en la lámina se realizaron según Hickey (1974). Se analizó el sistema sexual de la planta, y de las inflorescencias: tipo, posición, sexualidad y número. De las flores masculinas (♂) y femeninas (♀): longitud del pedicelo; número, disposición, forma, tipo de ápice y coloración de los tépalos, dimensiones

**TABLA I**

### Especímenes testigos de las plantas recolectadas y materiales consultados de taxones arbustivos de *Phyllanthus* en Cajálbana, La Palma, Pinar del Río, Cuba

Acrónimos de los herbarios citados según Thiers (2020) y de las series según recomienda Regalado & al. (2008).

**TABLE I**

### Vouchers of the collected plants and consulted materials of shrub taxa of *Phyllanthus* in Cajálbana, La Palma, Pinar del Río, Cuba

Herbarium acronyms cited according to Thiers (2020) and of the series as recommended by Regalado & al. (2008).

| Entidad según Webster (1956-1958) | Fecha                     | Recolección                     |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| <i>Phyllanthus x pallidus</i>     | 29 de junio del 2018      | Falcón & al. HFC 90023 (HAJB)   |
| <i>Phyllanthus x pallidus</i>     | 30 de junio del 2018      | Falcón & al. HFC 90026 (HAJB)   |
| <i>Phyllanthus x pallidus</i>     | 1 de julio del 2018       | Falcón & al. HFC 90029 (HAJB)   |
| <i>Phyllanthus x pallidus</i>     | 4 de julio del 2018       | Falcón & al. HFC 90037 (HAJB)   |
| <i>Phyllanthus discolor</i>       | 1 de julio del 2018       | Falcón & al. HFC 90032 (HAJB)   |
| <i>Phyllanthus orbicularis</i>    | 28 de agosto del 2015     | Falcón & al. HFC 88467 (HAJB)   |
| <i>Phyllanthus comptus</i>        | 12 de marzo del 1954      | Acuña & Schibert SV 19120 (DAV) |
| <i>Phyllanthus comptus</i>        | agosto del 1952           | Acuña SV 18222 (HAC)            |
| <i>Phyllanthus comptus</i>        | 28 de septiembre del 1952 | Acuña SV 17658 (HAC)            |

del tépalo mayor; grado de segmentación, forma, coloración del disco; número de estambres y longitud de la columna estaminal (en las flores ♂); posición, concrescencia y diámetro del ovario, y número, división y longitud de los estilos (en las flores ♀).

En el caso de *Phyllanthus comptus*, el hábito, tipo de ramificación, tamaño, sistema sexual, características de las inflorescencias, el número de tépalos y su coloración, y número de estambres se asumió según lo referido por Webster (1956-1958). Los restantes caracteres no pudieron ser evaluados pues solo se pudieron analizar materiales de herbario cuyas flores se encontraban inmaduras.

De cada individuo se evaluaron intercambiar y 10 flores de cada sexo, siempre que fue posible. Las dimensiones de las ramas floríferas y de las hojas se midieron con las herramientas del programa *Image J* y con una regla graduada ( $\pm 1$  mm). Para medir la longitud de los pedicelos (♂ y ♀), dimensiones de los tépalos (♂ y ♀), longitud de la columna estaminal, diámetro del ovario y longitud de las ramas del estilo, se empleó un estereoscopio con cámara acoplada y el programa *ScopelImage 9.0* con una regla ( $\pm 0,01$  mm).

Para el análisis morfométrico del contorno de la lámina, se realizaron imágenes digitales de 10 hojas por cada individuo, sin el contorno dañado, con un escáner (resolución de 300 dpi). Para ello se utilizó el programa *SHAPE 1.3* con sus subprogramas: *ChainCoder*, *Chc2Nef*, *PrinComp* y *PrinPrint* (Iwata & Ukai 2002) y se siguió el procedimiento empleado por Hernández & Falcón (2014).

### Análisis de la viabilidad del polen

Para el análisis de la viabilidad del polen se emplearon 20 flores de individuos diferentes de *Phyllanthus xpallidus*, 10 de *P. discolor* y 10 de *P. orbicularis*. No se realizó el análisis con *P. comptus* porque se trabajó con material de herbario y las flores se encontraban inmaduras. De cada planta se tomó al azar un botón floral y las anteras se colocaron en un portaobjeto. A la preparación se le añadió una o dos gotas de Gelatina de Acetocarmín Glicerol al 2 % (Marks 1954).

Posteriormente se extrajo el polen, se colocó en un portaobjeto y se esparció en el colorante con ligeros movimientos circulares. La muestra se dejó reposar por un minuto y se cubrió con un cubreobjeto. Las láminas se mantuvieron montadas en posición horizontal por dos días en cámara húmeda. Para analizar la viabilidad del polen se determinó el porcentaje de polen coloreado (que serían los fértiles). Para obtener el porcentaje de polen viable se anotó en cada muestra la cantidad de granos de polen coloreados entre total de granos de polen analizado. La observación de las preparaciones se realizó con un microscopio óptico con un aumento de 200 $\times$ . La estimación del porcentaje del polen viable se analizó según la escala basada en rangos de viabilidad propuesta por Ordoñez (2014), estéril (0), bajo (<50), moderado (50-80) y alto (80-100).

### Análisis estadístico

Se calculó para cada individuo la media y la desviación estándar de la longitud de las ramas floríferas, número de hojas por rama florífera, ancho, largo y relación largo/ancho de la lámina de las hojas, longitud de los pedicelos (♂ y ♀), longitud de los tépalos (♂ y ♀), longitud de la columna estaminal, longitud de las anteras y diámetro del ovario. Se verificó el ajuste a las premisas de normalidad y homocedasticidad con el empleo de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, para cada uno de los caracteres evaluados. Las variables número de hojas por rama florífera, relación largo/ancho de la lámina de las hojas, longitud de los pedicelos en las flores femeninas y diámetro del ovario no cumplieron con las premisas de normalidad y homogeneidad de varianza. Con los valores de las variables que se ajustaron a las premisas se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple modelo de efectos fijos seguidos de la prueba de comparación múltiple de medias para datos desbalanceados Método de Tukey-Kramer. Las variables que no cumplieron con las premisas se analizaron mediante ANOVAs de clasificación simple por rangos (Prueba de Kruskal-Wallis) seguidos de pruebas de comparación múltiple de rangos (Prueba de Dunn). En el caso de los caracteres reproductivos solo se analizaron las diferencias entre los taxones *Phyllanthus discolor*, *P. orbicularis* y *P. xpallidus*.

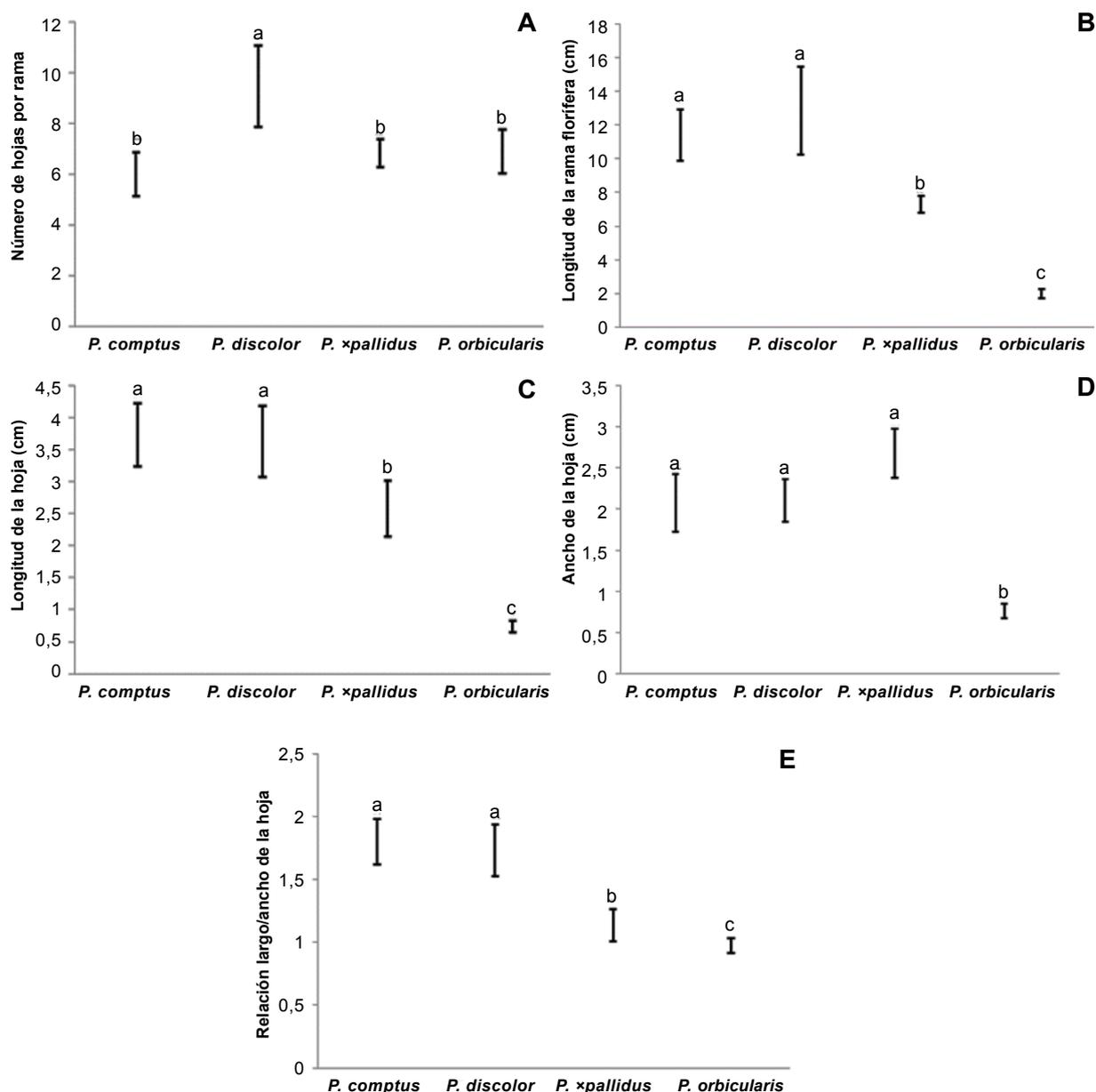
Se realizaron Análisis de Componentes Principales (ACP), a partir de las variables vegetativas y de las variables reproductivas, en todos se utilizó una matriz de varianza-covarianza. Se seleccionaron como variables de mayor contribución en cada componente, aquellas cuyo valor de autovector fue superior a la media del valor mínimo y máximo en cada componente. Las plantas pertenecientes a *Phyllanthus comptus* no fueron incluidas en el análisis estadístico de las variables reproductivas, por no encontrarse a la población en el momento de muestreo y solo contar con los materiales de herbario, los cuales presentaban flores inmaduras. Para visualizar las diferencias en cuanto al contorno de la hoja entre los taxones de *P. discolor*, *P. comptus*, *P. orbicularis* y *P. xpallidus*, se realizó un ACP con las medias de los coeficientes de los descriptores elípticos de Fourier. Los análisis estadísticos se realizaron con el empleo de los programas *Statistica 11.0* (StatSoft 2011) y *Past versión 2.17* (Hammer & al. 2001) y en el análisis del contorno de las hojas se utilizó la herramienta (add-ins) *PopTools versión 3.23* de Microsoft Excel 2010.

### RESULTADOS

*Phyllanthus xpallidus*, *P. discolor*, *P. comptus* y *P. orbicularis*, en la Sierra de Cajálbana son arbustos con ramificación filantoidea, las que presentan una altura entre 0,93 y 2,98 m. Las ramas floríferas en estos taxones presentaron longitudes significativamente diferentes (Figura 1A). Las plantas de *P. discolor* presentaron ramas floríferas tan largas como *P. comptus* y de mayor tamaño que *P. xpallidus*, y estas últimas presentaron longitudes intermedias entre los valores de *P. orbicularis* y *P. discolor* (Figura 1B).

El número de hojas por rama florífera es significativamente mayor en los individuos de *Phyllanthus discolor*, entre ocho y once (Figura 1A); sin embargo, es similar en las plantas de *P. x pallidus*, *P. comptus* y *P. orbicularis* (todas entre seis y ocho). El peciolo de las hojas presenta longitudes equivalentes en *P. discolor*, *P. x pallidus* y en *P. comptus* (0,29-0,37 cm; 0,33-0,34 cm y 0,36-0,45 cm, respectivamente) y es de menor longitud en *P. orbicularis* (0,10 cm). La longitud de la lámina de las hojas de *P. discolor*, *P. x pallidus* y *P. comptus* son simi-

lares y significativamente mayores a las de las plantas de *P. orbicularis* (Figura 1C). El ancho de la lámina de la hoja de *P. x pallidus* es el de mayor valor (2,00-2,70 cm), no obstante, estadísticamente similar al de las plantas de *P. discolor* y *P. comptus* (Figura 1D). Los menores valores se presentan en *P. orbicularis* (0,70-0,90 cm). La relación largo/ancho de la lámina de las hojas en las plantas de *P. x pallidus* y de *P. orbicularis* fue similar y significativamente menor con respecto a *P. comptus* y *P. discolor* (Fig. 1E).



**Fig. 1.** Variabilidad de cinco caracteres vegetativos en taxones arbustivos del género *Phyllanthus* en Cajálbana, Pinar del Río. **A.** Número de hojas por rama florífera. **B.** Longitud de las ramas floríferas. **C.** Largo de la hoja. **D.** Ancho de la hoja. **E.** Relación largo/ancho de la lámina. Las letras encima de las barras representan las diferencias estadísticamente significativas entre los taxones ( $p < 0,05$ ) según Prueba de Dunn (A y E) y Prueba de Tukey-Kramer (B, C y D).

**Fig. 1.** Variability of five vegetative characters in shrub taxa of the genus *Phyllanthus* in Cajálbana, Pinar del Río. **A.** Number of leaves per floriferous branch. **B.** Length of the floriferous branches. **C.** Length of the blade. **D.** Width of the sheet. **E.** Length / width ratio of the sheet. The letters above the bars represent statistically significant differences between taxa ( $p < 0.05$ ) according to Dunn (A and E) and Tukey-Kramer's test (B, C and D)

En los taxones analizados las hojas son alternas, en las plantas de *Phyllanthus orbicularis* (Figura 2A) la lámina de las hojas tiende a ser orbicular, por lo general con el ápice y la base redondeados, las plantas de *P. xpallidus* (Figura 2B) presentan la lámina ovada-orbicular y el ápice y la base redondeados; mientras que en las plantas de *P. discolor* (Figura 2C) y *P. comptus* poseen la forma de la lámina ovada, con ápice y base obtusos. El margen es plano en *P. discolor*, *P. xpallidus* y *P. comptus*; mientras que, en *P. orbicularis* es revoluto.

El ACP realizado con los caracteres vegetativos mostró que con solo dos componentes principales se logró explicar el 97,54 % de la variabilidad total. En la Tabla II se muestra la contribución de cada caracter en cada componente principal. Los caracteres vegetativos de mayor contribución en la formación de los grupos fueron: la longitud de la rama florífera, el número de hojas por rama y la longitud de la lámina de la hoja. En la Figura 3 se observa la separación del material evaluado en cuatro grupos, el primero formado por los individuos de *Phyllanthus orbicularis*, el segundo por los individuos de *P. xpallidus*, el tercero con los individuos de *P. discolor* y el cuarto por *P. comptus*.

La reconstrucción del contorno de la lámina de las hojas obtenida por los puntajes principales mostró que los dos primeros componentes describieron la variación en la forma de la lámina (Figura 4). La forma de la lámina de la hoja varió desde ovada hasta orbicular. El primer componente principal explicó la mayor parte de la varianza (80,1592 %) y las diferencias entre la base y el ápice de las láminas de los taxones estudiados. El segundo componente principal explicó parte de la variación de la base y el ápice de la lámina de las hojas (6,5679 %), los dos componentes juntos explicaron más de 86 % de la variación.

El ACP de los coeficientes de los descriptores elípticos de Fourier reflejó la separación de los taxones en cuanto al contorno de las láminas de las hojas en dos grupos (Figura 5). Los individuos de *Phyllanthus discolor* y *P. comptus* tienden a la forma ovada de la lámina de la hoja y no difieren entre sí en cuanto a este carácter. Los individuos de *P. xpallidus* y *P. orbicularis* presentan una propensión hacia la forma orbicular.

Por otra parte, varios individuos de *P. xpallidus* se agruparon hacia el centro con características intermedias entre los dos grupos extremos formados.

Las plantas de *Phyllanthus xpallidus*, *P. discolor*, *P. orbicularis* y *P. comptus* son monoicas, presentan inflorescencias de tipo címula, las cuales se ubican en las axilas de las hojas de las ramas floríferas. En el caso de las plantas de *P. xpallidus* y *P. discolor* presentan de 1-3 flores femeninas en el centro y de 4-6 flores masculinas en los laterales de la inflorescencia. En el caso de *P. orbicularis*, las címulas presentaron solo una flor femenina por címula. En *P. comptus* la inflorescencia presenta una flor femenina y de 5-8 flores masculinas.

Las flores masculinas de las plantas de *Phyllanthus orbicularis* presentan pedicelos significativamente mayores a los de las plantas de *P. xpallidus* y *P. discolor* (Figura 6). En las plantas de *P. discolor* y *P. xpallidus*, las flores masculinas tienen cinco tépalos elípticos fusionados en la base, mientras que en las plantas de *P. orbicularis* y *P. comptus* los tépalos son por lo general seis, raramente cinco, fusionados en la base y de forma elíptica. El ápice de los tépalos es redondeado en todos los taxones analizados. La longitud de los tépalos es mayor en *P. orbicularis*, mientras que no es diferente entre *P. xpallidus* y *P. discolor* (Figura 6).

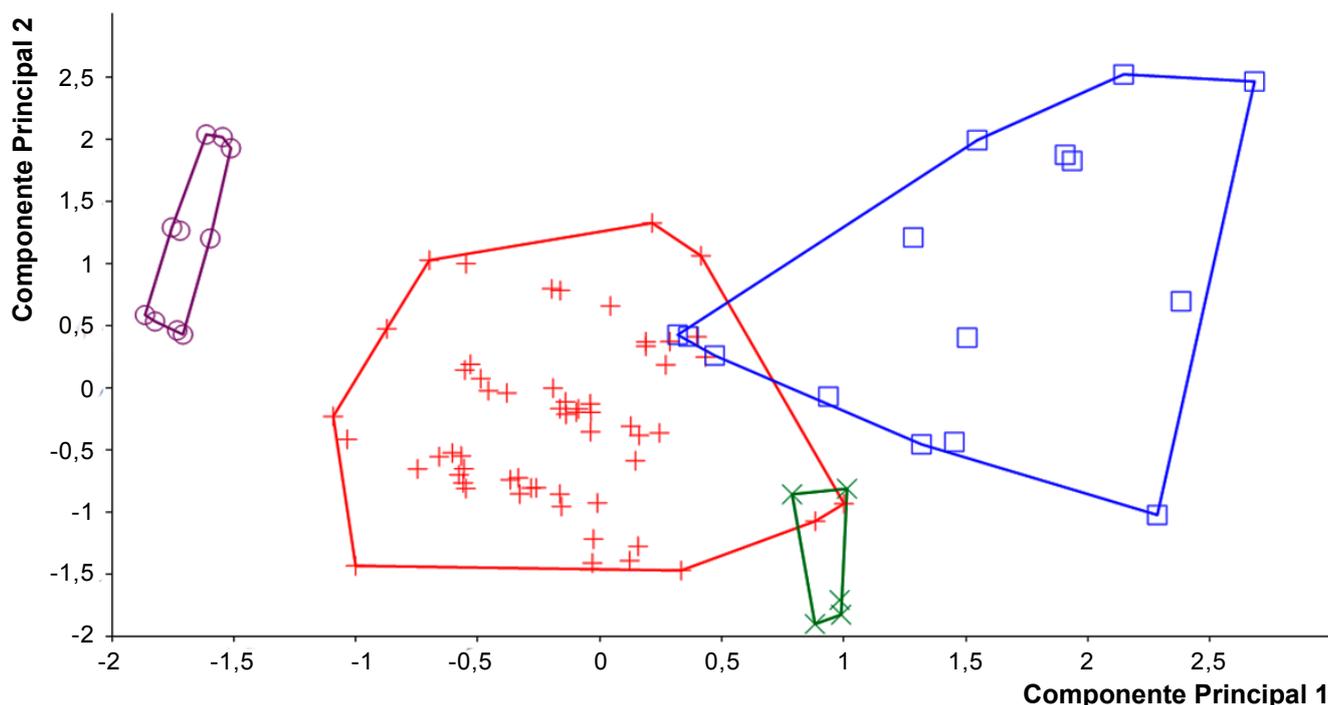
La coloración de los tépalos en las flores masculinas en *Phyllanthus discolor* y *P. xpallidus* es blanca, mientras que, en *P. orbicularis* es por lo general, rosada y en *P. comptus* la coloración es verde. Todas las flores masculinas analizadas presentan disco nectarífero segmentado, donde el número de segmentos coincide con el número de tépalos. En *P. orbicularis* el disco es de forma hexagonal y de color rojo, a la vez que es pentagonal y de color verde en *P. discolor* y *P. xpallidus*. En todos los casos el disco se encuentra en la base de los estambres. El número estambres es mayor en los individuos de *P. xpallidus* (9-16 estambres), seguido por *P. discolor* (8-13 estambres), *P. orbicularis* (6 estambres) y *P. comptus* (4-8 estambres).

El ACP realizado a partir de los caracteres reproductivos de las flores masculinas (longitud del pedicelo, dimensiones de



**Fig. 2.** Ramas floríferas de taxones arbustivos del género *Phyllanthus* en Cajálbana, Pinar del Río. **A.** *Phyllanthus orbicularis*. **B.** *Phyllanthus xpallidus*. **C.** *Phyllanthus discolor*. Barras de escala: 1 cm.

**Fig. 2.** Flower branches of shrub taxa of the genus *Phyllanthus* in Cajálbana, Pinar del Río. **A.** *Phyllanthus orbicularis*. **B.** *Phyllanthus xpallidus*. **C.** *Phyllanthus discolor*. Scale bar: 1 cm.



**Fig. 3.** Análisis de Componentes Principales de los caracteres: longitud de la rama florífera, número de hojas por rama florífera, longitud de la lámina de la hoja, ancho de la lámina de la hoja y relación largo/ancho de la lámina de la hoja; de los taxones arbustivos del género *Phyllanthus* en Cajalbana, Pinar del Río. ○ morado: *P. orbicularis*, + rojo: *P. xpallidus*, □ azul: *P. discolor*, × verde: *P. comptus*.

**Fig. 3.** Principal Components Analysis of the characters: length of the floriferous branch, number of leaves per floriferous branch, length of the leaf blade, width of the leaf blade and length/width ratio of the leaf blade. The shrub taxa of the genus *Phyllanthus* in Cajalbana, Pinar del Río. ○ purple: *P. orbicularis*, + red: *P. xpallidus*, □ blue: *P. discolor*, × green: *P. comptus*.

**TABLA II**

**Autovalores y autovectores obtenidos en el análisis de componentes principales de los caracteres vegetativos de los taxones arbustivos de *Phyllanthus* en Cajalbana, Pinar del Río, Cuba**

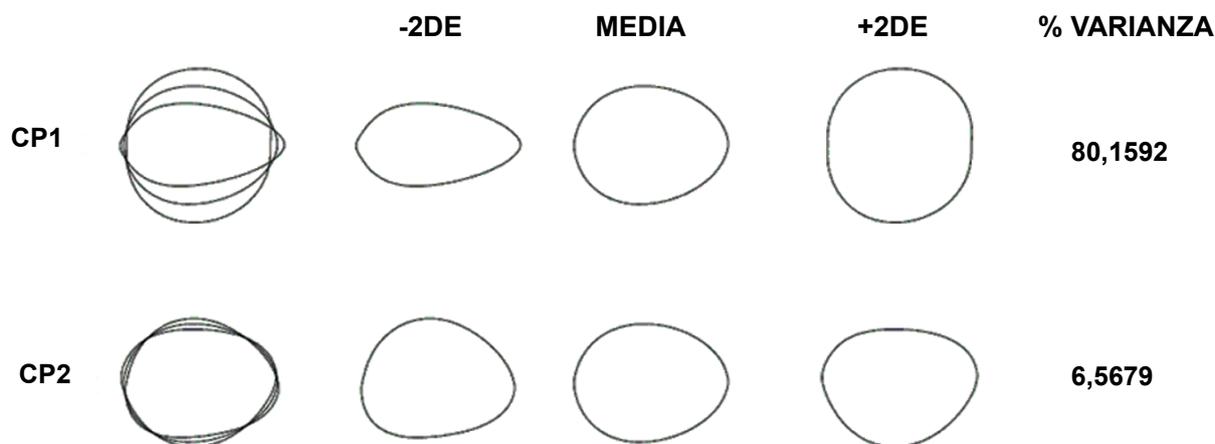
Se resaltan en negrita los autovectores de mayor contribución en cada componente.

**TABLE II**

**Eigenvalues and eigenvectors obtained in the principal component analysis of the vegetative characters of the shrub taxa of *Phyllanthus* in Cajalbana, Pinar del Río, Cuba**

The highest contribution eigenvectors in each component are highlighted in bold.

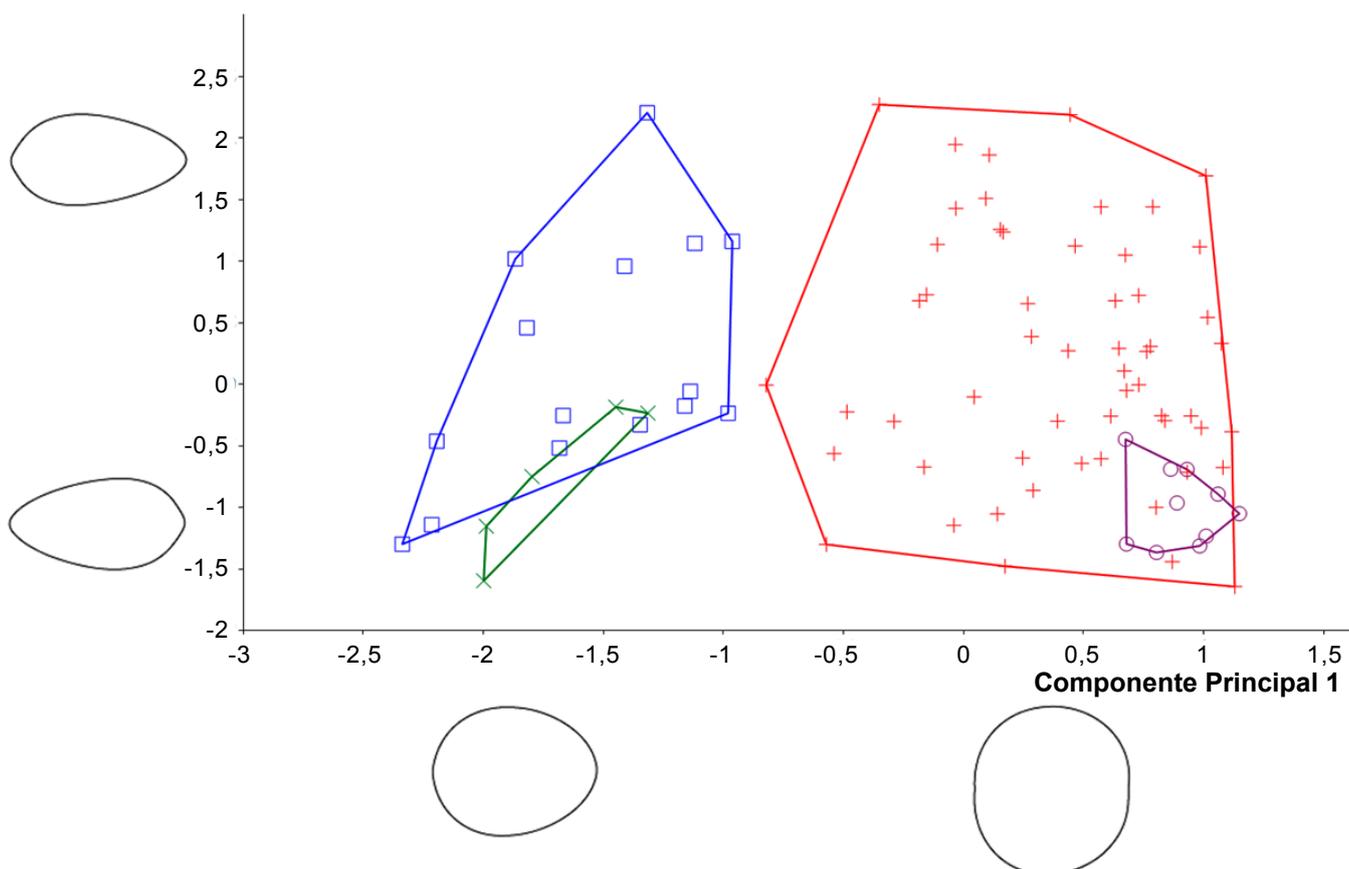
|                                  | Componentes Principales |              |
|----------------------------------|-------------------------|--------------|
|                                  | CP1                     | CP2          |
| Autovalor                        | 13,31                   | 1,40         |
| Autovalor %                      | <b>88,25</b>            | 9,29         |
| % acumulado                      | 88,25                   | <b>97,54</b> |
| Autovectores                     | CP1                     | CP2          |
| <b>Caracteres</b>                |                         |              |
| Longitud de la rama florífera    | <b>0,93</b>             | -0,01        |
| Número de hojas por rama         | <b>0,24</b>             | <b>0,92</b>  |
| Longitud de la lámina de la hoja | 0,21                    | <b>-0,25</b> |
| Ancho de la lámina de la hoja    | 0,08                    | -0,21        |
| Relación largo/ancho de la hoja  | 0,06                    | -0,01        |



**Fig. 4.** Reconstrucción gráfica de los contornos de las láminas en las hojas de los taxones arbustivos de *Phyllanthus* en Cajálbana, Pinar del Río. Se observa la varianza que explican los dos primeros componentes principales respecto a la forma de la lámina de la hoja.

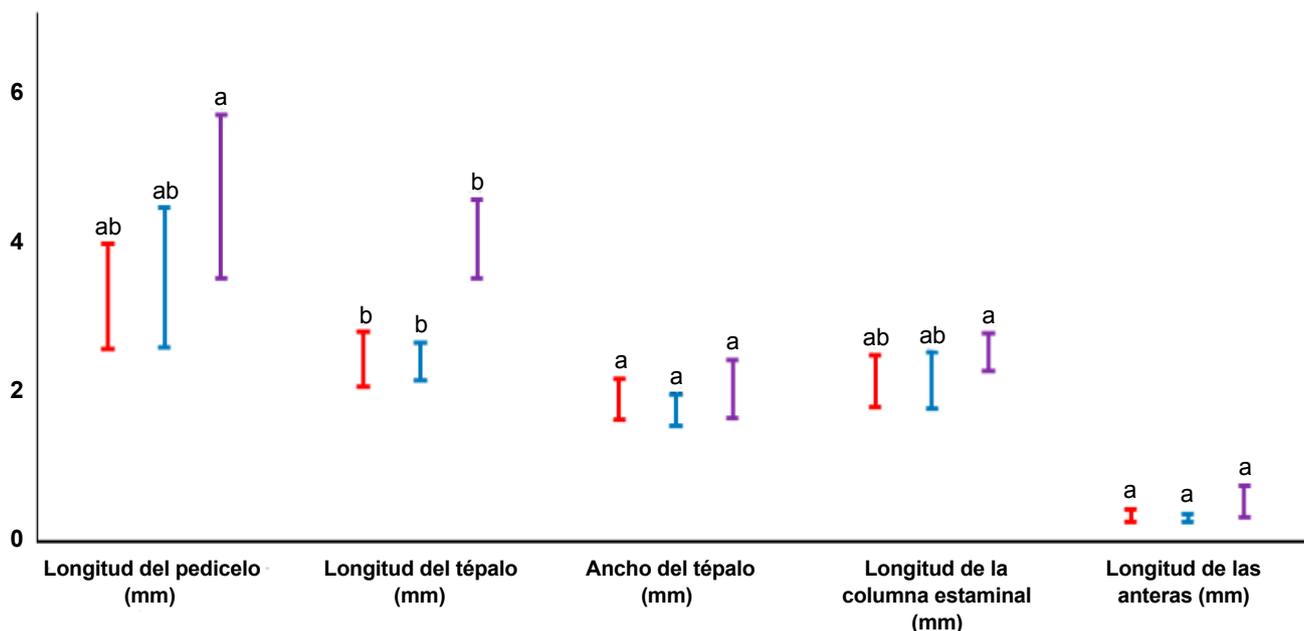
**Fig. 4.** Graphic reconstruction of the outline of blade of the leaves of the shrub species of *Phyllanthus* in Cajálbana, Pinar del Río. The variance that explains the first two main components regarding the shape of the leaf blade is observed.

### Componente Principal 2



**Fig. 5.** Análisis de Componentes Principales de los coeficientes de los descriptores elípticos de Fourier que explican la forma de la lámina de la hoja de los taxones arbustivos de *Phyllanthus* en Cajálbana, Pinar del Río. Se observa la reconstrucción del contorno (media  $\pm$  desviación estándar) que explica cada componente.  $\circ$  morado: *P. orbicularis*,  $+$  rojo: *P. xpallidus*,  $\square$  azul: *P. discolor*,  $\times$  verde: *P. comptus*.

**Fig. 5.** Principal Components Analysis of the Elliptic Fourier that explain the shape of the leaf blade of the *Phyllanthus* shrub species in Cajálbana, Pinar del Río. The reconstruction of the contour (mean  $\pm$  standard deviation) that explains each component is observed.  $\circ$ purple: *P. orbicularis*,  $+$  red: *P. xpallidus*,  $\square$  blue: *P. discolor*,  $\times$  green: *P. comptus*.



**Fig. 6.** Variabilidad de caracteres cuantitativos en las flores masculinas de los taxones *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* en Cajalbana, Pinar del Río. Para cada variable, de izquierda a derecha los taxones representados son: *P. discolor*, *P. x pallidus* y *P. orbicularis*. Las letras encima de las barras representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) según Prueba de Tukey-Kramer.

**Fig. 6.** Variability of quantitative characters in male flowers of the taxa *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* and *P. orbicularis* in Cajalbana, Pinar del Río. For each variable, from left to right the taxa represented are: *P. discolor*, *P. x pallidus* and *P. orbicularis*. The letters above the bars represent the statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) according to the Tukey-Kramer test.

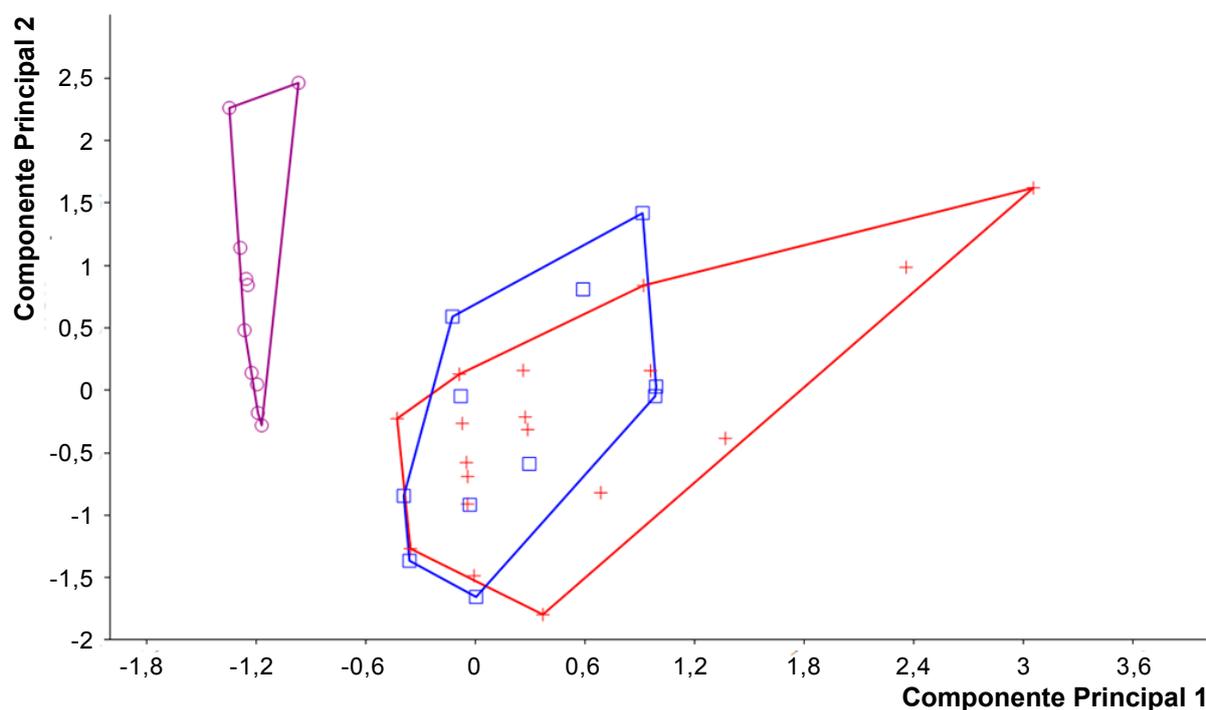
los tépalos, dimensiones de la columna estaminal, número de estambres y longitud de las anteras) mostró que con solo dos componentes principales se logró explicar el 92,36 % de la variabilidad total. En Tabla III se muestra la contribución de los caracteres en cada componente principal, donde los de mayor importancia en la formación de los grupos son: el número de estambres, la longitud del pedicelo y la longitud de los tépalos. En la Figura 7 se evidencia la separación de la muestra total en dos grupos bien definidos, el primero con los individuos pertenecientes a *P. orbicularis* y el segundo conformado por los taxones *P. discolor* y *P. x pallidus*

Las flores femeninas de las plantas de *Phyllanthus orbicularis* tienen los pedicelos significativamente menores a los de las plantas de *P. x pallidus* y *P. discolor* (Figura 8). Las flores femeninas de *P. discolor* y *P. x pallidus* presentan simetría radial y está compuesto mayormente por cinco tépalos. Los tépalos son obovados con ápice redondeado y de color mayormente blanco. Por su parte, en *P. orbicularis*, las flores femeninas presentan simetría radial y el número de tépalos es generalmente seis, los que son generalmente elípticos con el ápice redondeado y de color rosado. En *P. comptus*, la flor femenina presenta, seis tépalos (raramente cinco) de color verde y con el ápice redondeado.

La longitud y diámetro de los tépalos de las flores femeninas de las plantas de *P. orbicularis* es significativamente mayor al de las flores de *P. discolor* y *P. x pallidus* (Figura 8). En el

disco nectarífero de los taxones analizados, los segmentos se fusionan y su número es igual al número de tépalos. En *P. discolor* y *P. x pallidus* el disco es pentagonal y de color verde, mientras que en *P. orbicularis* el disco nectarífero es hexagonal y de color rojo. Los ovarios fueron súperos, sincápicos y generalmente subglobosos en todos los taxones estudiados. La longitud del ovario no presentó diferencias significativas entre los taxones analizados. El diámetro del ovario de las plantas de *P. x pallidus* es intermedio entre los valores observados de las flores de *P. discolor* y *P. orbicularis*, este último fue significativamente menor al resto de los taxones estudiados (Figura 8). Todas las flores femeninas analizadas presentan tres estilos, en *P. orbicularis* son bifidos con los extremos revolutos, están unidos forman una columna estilar; mientras que en *P. discolor* y *P. x pallidus* los estilos fueron bifidos, pero no constituyen una columna. Los estilos de *P. orbicularis* son de mayor tamaño (1,80-2,33 mm) que los de *P. discolor* y *P. x pallidus*, que presentan longitudes similares (0,75-1,30 mm).

Sólo en individuos de *Phyllanthus x pallidus* se hallaron anomalías morfológicas en las flores femeninas (Figura 9). Fue encontrada una flor hermafrodita, con un ovario unicarpelar y una columna estaminal conformada por ocho estambres (Figura 9A), un ovario tricarpelar en el cual dos carpelos se fusionan y uno queda libre (Figura 9B) y se encontraron ovarios pedunculados con longitudes entre 0,53-1,17 mm (Figuras 9C y 9D).



**Fig. 7.** Análisis de Componentes Principales de los caracteres: longitud del pedicelo, dimensiones de los tépalos, longitud de la columna estaminal, número de estambres y longitud de las anteras de las flores masculinas de los taxones *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* en Cajálbana, Pinar del Río.  $\circ$ morado: *P. orbicularis*, + rojo: *P. x pallidus*,  $\square$  azul: *P. discolor*.

**Fig. 7.** Principal Components Analysis of the characters: length of the pedicel, dimensions of the tepals, length of the staminal column, number of stamens and length of the anthers of the nectariferous disk of the male flowers of the taxa *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* in Cajálbana, Pinar del Río.  $\circ$ purple: *P. orbicularis*, + red: *P. x pallidus*,  $\square$  blue: *P. discolor*.

**TABLA III**

**Autovalores y autovectores obtenidos en el análisis de componentes principales de los caracteres de las flores masculinas de *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* en Cajálbana, Pinar del Río, Cuba.**

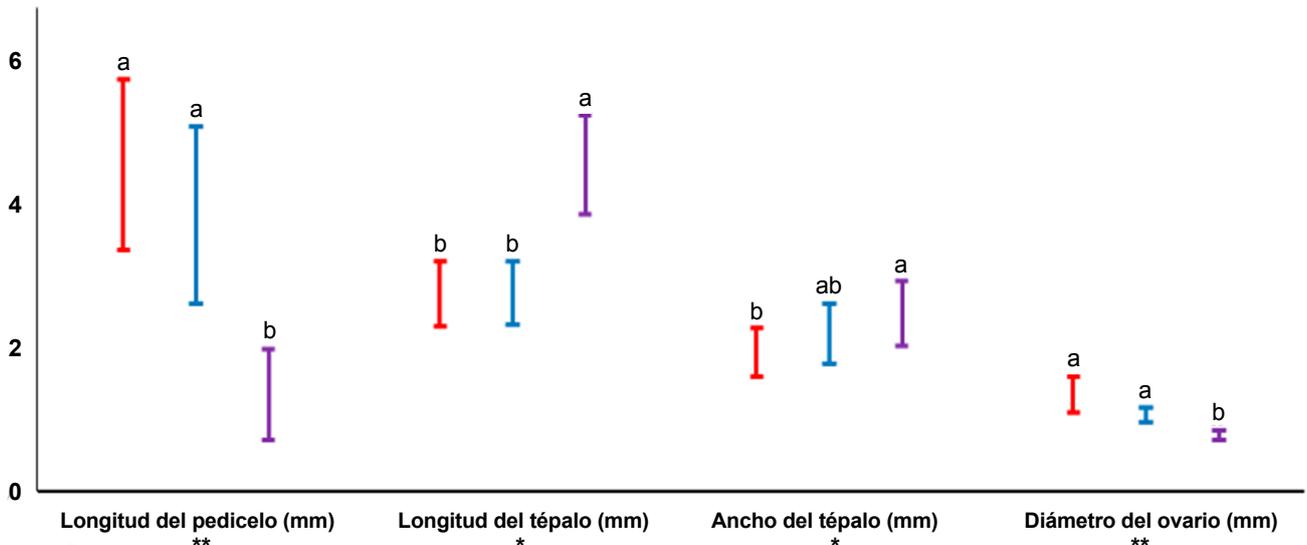
Se resaltan en negrita los autovectores de mayor contribución en cada componente.

**TABLE III**

**Eigenvalues and eigenvectors obtained in the principal components analysis of the characteristics of the male flowers of the *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* in Cajálbana, Pinar del Río.**

The highest contribution eigenvectors in each component are highlighted in bold.

|   | Componentes Principales |              |
|---|-------------------------|--------------|
|   | CP1                     | CP2          |
| Autovalor                                   | 8,36                    | 1,57         |
| Autovalor %                                 | <b>77,68</b>            | 14,68        |
| % acumulado                                 | 77,68                   | <b>92,36</b> |
| Autovectores                                | CP1                     | CP2          |
| <b>Caracteres</b>                           |                         |              |
| Longitud del pedicelo (flor ♂)              | -0,11                   | <b>-0,65</b> |
| Longitud del tépalo (flor ♂)                | -0,11                   | <b>0,43</b>  |
| Ancho del tépalo (flor ♂)                   | -0,01                   | 0,09         |
| Relación longitud/ancho del tépalo (flor ♂) | -0,07                   | 0,15         |
| Longitud de la columna estaminal            | -0,02                   | 0,20         |
| Números de estambres                        | <b>0,94</b>             | 0,28         |
| Longitud de las anteras                     | -0,02                   | 0,06         |



**Fig. 8.** Variabilidad de caracteres cuantitativos de las flores femeninas en *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* en Cajálbana, Pinar del Río. Para cada variable, de izquierda a derecha los taxones representados son: *P. discolor*, *P. x pallidus* y *P. orbicularis*. Las letras encima de las barras representan las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los taxones según: Prueba de Tukey–Kramer (\*) y Prueba de Dunn (\*\*).

**Fig. 8.** Variability of quantitative characteristics of female flowers in *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* and *P. orbicularis* in Cajálbana, Pinar del Río. For each variable, from left to right the taxa represented are: *P. discolor*, *P. x pallidus* and *P. orbicularis*. The letters above the bars represent the statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the taxa according to: Tukey-Kramer (\*) and Dunn's test (\*\*).



**Fig. 9.** Anomalías morfológicas encontradas en individuos de *Phyllanthus x pallidus* en Cajálbana, Pinar del Río. Barras de escala: 1,0 mm.

**Fig. 9.** Morphological anomalies found in individuals of *Phyllanthus x pallidus* in Cajálbana, Pinar del Río. Scale bars: 1.0 mm.

En el ACP realizado en las flores femeninas a partir de los caracteres reproductivos (longitud del pedicelo, dimensiones de los tépalos, diámetro y longitud del ovario) mostró que con solo dos componentes principales se logró explicar el 87,31 % de la variabilidad total (Figura. 10). En la Tabla IV se muestra la contribución de cada caracter en cada componente principal, donde los que más contribuyeron en la formación de los grupos fueron: la longitud del pedicelo y las dimensiones de los tépalos. En el ACP se observa la separación en dos grupos bien definidos, el primero conformado por los individuos pertenecientes a *P. orbicularis* y el segundo por los individuos de *P. discolor* y *P. x pallidus* (Figura 10).

#### Análisis de la viabilidad del polen

En el análisis de la viabilidad del polen con la aplicación del Acetocarmín Glicerol al 2 % se logró diferenciar los granos teñidos de los no teñidos (Figura 11). De acuerdo con lo observado, los granos de polen de *P. discolor* (99,25 %), *P. orbicularis* (100 %) y *P. x pallidus* (95,86 %) mostraron altos porcentajes de viabilidad.

#### DISCUSIÓN

En los taxones arbustivos de *Phyllanthus* en Cajálbana, La Palma, Pinar del Río los caracteres vegetativos de mayor importancia para su delimitación fueron: la longitud de las ramas

floríferas, el número de hojas por rama florífera y la forma de la lámina de la hoja. Estos fueron considerados diagnósticos en los trabajos de Webster (1956-1958) para delimitar especies del género en las islas del Caribe y específicamente para la delimitación de las entidades de *Phyllanthus* sect. *Orbicularia* en Cuba (Fiallo 2018, Falcón 2019).

Específicamente, *Phyllanthus* *xpallidus* con respecto a *P. discolor* presentó menores valores en los caracteres: longitud de la rama florífera, número de hojas por rama y longitud de la lámina de la hoja (Figura 1). No obstante, en el ACP de los caracteres vegetativos, *P. xpallidus* mostró un patrón de agrupamiento hacia *P. discolor* (Figura 3). Las menores dimensiones del híbrido pudieran deberse a que habita como parte del estrato arbustivo del matorral xeromorfo espinoso sobre serpentina mientras que *P. discolor* solo se encontró en el bosque de galería en el ecotono entre el cuabal y el bosque siempreverde de Cajálbana. Se conoce que por lo general las plantas que se encuentran en ambientes xeromorfos tienen una anatomía y forma de crecimiento especialmente adaptadas a condiciones desérticas (Farooqi & al. 1994). La reducción de la rama florífera, el número de hojas por rama y la longitud de la lámina de la hoja en *P. xpallidus*, pudiera ser una estrategia para disminuir la pérdida de agua por transpiración.

Entre *Phyllanthus discolor* y *P. comptus* no se encontraron diferencias significativas en la longitud de la rama florífera ni en las dimensiones de la lámina de la hoja (Figura 1B). Similares resultados fueron referidos por Webster (1956-1958), lo que lo llevó a concluir en gran medida a *P. comptus* y *P. discolor* como los parentales de *P. xpallidus*. Sin embargo, Solbrig & Solbrig (1979) refirieron que los híbridos suelen presentar fenotipos intermedios a los propios de las especies parentales y pueden expresar un mosaico de fenotipos parentales, que depende de las características evaluadas y la interacción entre su expresión genética y el ambiente (Rieseberg & Carney 1998). En este estudio, *P. xpallidus* no mostró valores intermedios entre los caracteres analizados de *P. discolor* y *P. comptus*, sino que, si se tienen en cuenta la longitud de la rama florífera, el número de hojas por rama y la relación largo/ancho de la lámina, este híbrido fue fenotípicamente intermedio entre las especies *P. discolor* y *P. orbicularis* (Figura 1A, 1B y 1E).

Por otra parte, el híbrido no presentó diferencias significativas con *Phyllanthus orbicularis* respecto a la relación largo/ancho de la lámina (Figura 1E) y en ambos casos la forma es ovada-orbicular, lo que también se observa en el ACP de la reconstrucción de los contornos (Figura 5). Hickey (1974), resaltó que la relación largo/ancho de la lámina tiende a explicar mejor la forma de la misma. Asimismo, el análisis del contorno permite explicar la forma, tras remover los efectos de la escala, la rotación y la traslación de un objeto (Rohlf & Slice 1990). De ahí que no sea extraño que a pesar de las diferencias observadas entre las dimensiones de la lámina de la hoja al comparar a *P. xpallidus* con *P. orbicularis* se encontrara una similitud en cuanto a estos caracteres. Esta evidencia podría ser el resultado de sucesivos cruzamientos entre una generación híbrida y *P. orbicularis* producto de una posible introgresión de los

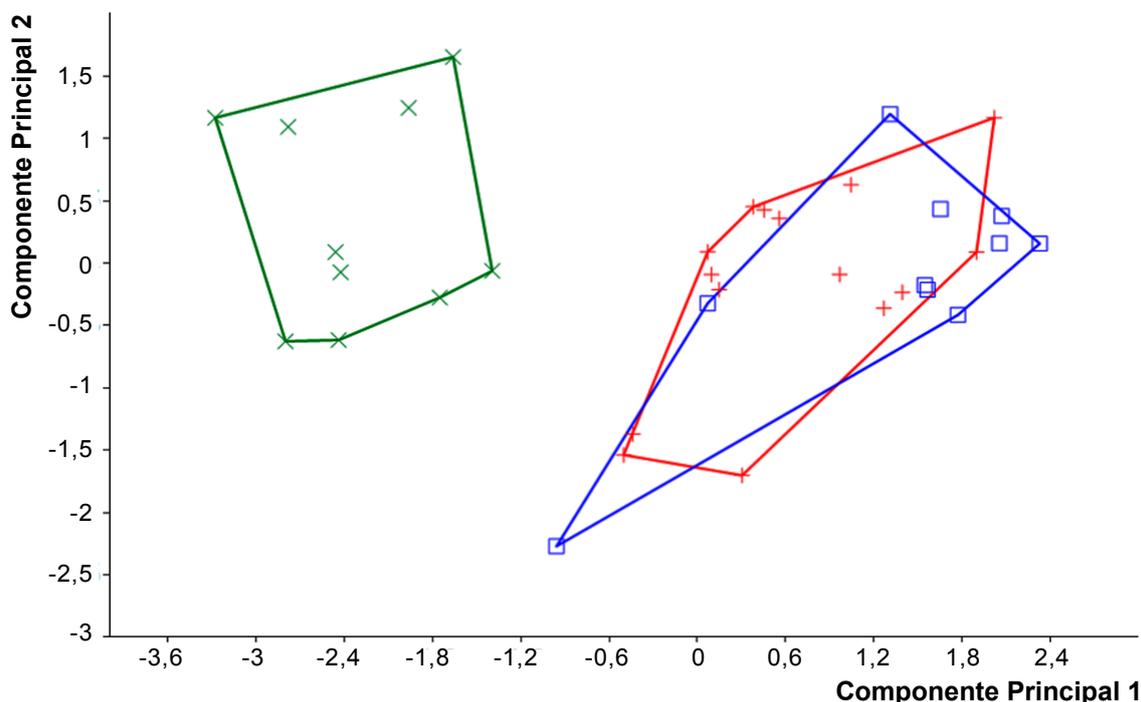
caracteres de esta especie en el híbrido. Anderson (1948), refirió que en los híbridos, la introgresión de caracteres de las especies parentales es un fenómeno habitual y se evidencia fenotípicamente en la similitud entre el parental y la forma híbrida.

Para la formación de híbridos, una de las características más importantes es la superposición de sus rangos de distribución (Müller 1952). En Cajálbana, las poblaciones de *Phyllanthus orbicularis* y *P. xpallidus* se encuentran superpuestas y bien establecidas cercanas al bosque de galería donde habita *P. discolor*; mientras que *P. comptus* solo se recolectó tres veces, en los años 1952 y 1954. Esta situación existente en Cajálbana pudiese haber propiciado una condición del tipo ecotonal, lo que probablemente determinaría la formación de un "hábitat híbrido" donde, según lo propuesto por Anderson (1948), se facilita el desarrollo de individuos híbridos.

La hipótesis de que los parentales de *Phyllanthus xpallidus* pudieran ser *P. discolor* y *P. orbicularis* fue enunciada por Berazaín & al. (2007), en su estudio de las especies hiperacumuladoras de Ni del género *Phyllanthus* en Cuba. El análisis mostró que tanto *P. xpallidus* como *P. discolor*, y *P. orbicularis* presentaban un patrón similar de acumulación de Ni en los tejidos de la lámina de la hoja, aunque el híbrido mostró más analogía con *P. discolor* y presentó un valor de acumulación superior a los demás taxones. Una posible hibridación entre *P. discolor* y *P. orbicularis* pudiese estar apoyada por lo enunciado por Hill & Jordan (1993), referido a que la hibridación entre dos taxones suele estar facilitada por su cercanía filogenética y en este caso los dos taxones pertenecen al subgénero *Xylophylla* sect. *Williamia*, mientras que, *P. comptus* aunque pertenece al mismo subgénero se encuentra en la sect. *Thamnocharis* (Webster 1956-1958, Falcón & al. 2020).

Los caracteres reproductivos de mayor importancia para la delimitación de los taxones arbustivos de *Phyllanthus* en Cajálbana fueron: el número de estambres, las dimensiones de los tépalos, la longitud del pedicelo y la morfología del ovario. La longitud de pedicelo de las flores parece ser un carácter de gran importancia en la clasificación de *Phyllanthus* ya que permite diferenciar las especies de este género de otros relacionados como *Savia Willd.* (Webster 1956-1958), la delimitación de las subespecies de *P. orbicularis* (Falcón & al. 2018) e identificar las especies de *Phyllanthus* subsect. *Incrustati* (Figueroa 2016).

El análisis morfológico de los caracteres de las flores masculinas reveló que los individuos de *Phyllanthus xpallidus* resultaron similares a *P. discolor* (Figura 6). Este resultado confirma la descripción de Webster (1956-1958) y concuerda con el ACP realizado en este estudio (Figura 7). Esta semejanza en las flores masculinas de estos dos taxones sugiere el fenómeno de introgresión presente en los híbridos (Anderson 1948), explicado anteriormente, en el cual a lo largo de las generaciones se incrementan las similitudes del híbrido respecto a una de las especies parentales, el mismo podría ser el resultado de sucesivos cruzamientos entre una generación híbrida y el tipo parental *P. discolor*.



**Fig. 10.** Análisis de Componentes Principales de los caracteres: longitud del pedicelo, dimensiones de los tépalos, altura y diámetro de ovario de las flores femeninas de *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* en Cajálbana, Pinar del Río. x verde: *P. orbicularis*, + rojo: *P. x pallidus*, □ azul: *P. discolor*.

**Fig. 10.** Principal Components Analysis of the characters: length of the pedicel, dimensions of the tepals, height and diameter of the ovary and of the female flower of the shrub taxa of *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* in Cajálbana, Pinar del Río. x green: *P. orbicularis*, + red: *P. x pallidus*, □ blue: *P. discolor*.

**TABLA IV**

**Autovalores y autovectores obtenidos en el análisis de componentes de los caracteres de las flores femeninas de *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* en Cajálbana, Pinar del Río, Cuba.**

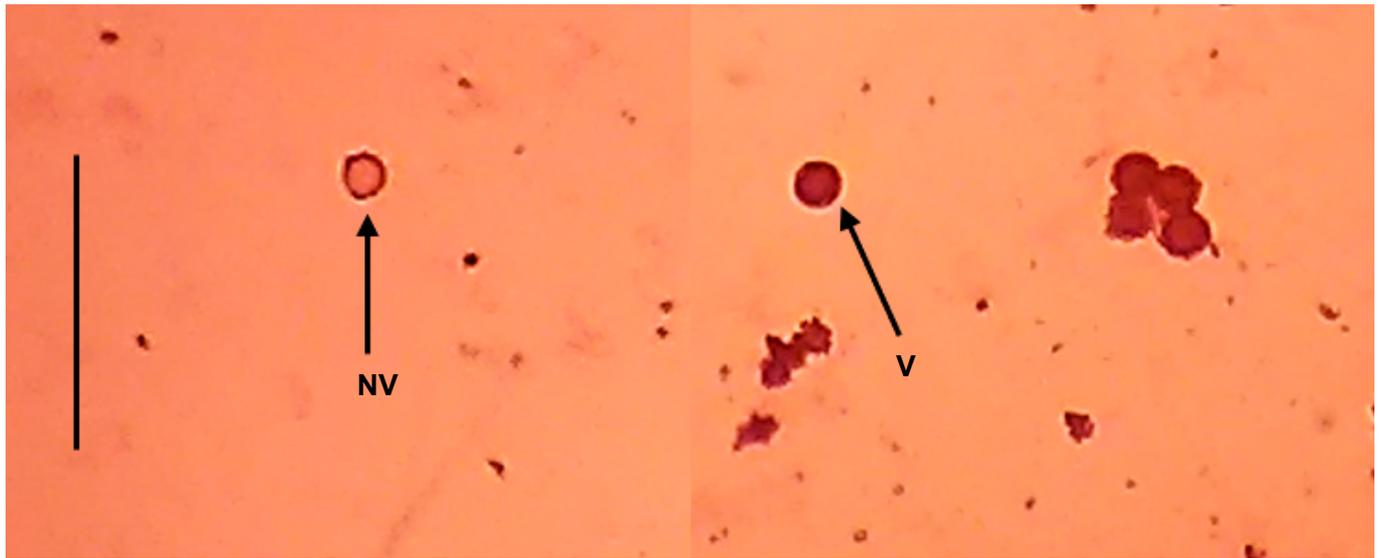
Se resaltan en negrita los autovectores de mayor contribución en cada componente.

**TABLE IV**

**Eigenvalues and eigenvectors obtained in the principal components analysis of the characteristics of the female flowers of the *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* in Cajálbana, Pinar del Río, Cuba.**

The highest contribution eigenvectors in each component are highlighted in bold.

|   | Componentes Principales |              |
|---|-------------------------|--------------|
|   | CP1                     | CP2          |
| Autovalor                                   | 3,59                    | 0,78         |
| Autovalor %                                 | <b>71,53</b>            | 15,73        |
| % acumulado                                 | 71,53                   | <b>87,31</b> |
| Autovectores                                | CP1                     | CP2          |
| <b>Caracteres</b>                           |                         |              |
| Longitud del pedicelo (flor ♀)              | <b>-0,85</b>            | -0,47        |
| Longitud del tépalo (flor ♀)                | <b>0,40</b>             | <b>0,73</b>  |
| Ancho del tépalo (flor ♀)                   | 0,08                    | <b>0,39</b>  |
| Relación longitud/ancho del tépalo (flor ♀) | 0,11                    | 0,19         |
| Diámetro del ovario                         | -0,09                   | 0,04         |
| Longitud del ovario                         | -0,05                   | 0,03         |



**Fig. 11.** Análisis de la viabilidad del polen con el uso del colorante Gelatina de Acetocarmín Glicerol al 2 % en *Phyllanthus x pallidus*. NV: Polen no viable; V: Polen viable. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

**Fig. 11.** Analysis of pollen viability with the use of 2 % Acetocarmine Glycerol Gelatin the in *Phyllanthus x pallidus*. NV: Not viable pollen; V: Viable pollen. Scale bar: 50  $\mu$ m.

En las observaciones de campo realizadas en Cajálbana para este estudio, se pudo apreciar que tanto los individuos de *Phyllanthus discolor* como los de *P. orbicularis* se encontraban florecidos. Una de las características más importantes para la formación de híbridos interespecíficos es la superposición de los periodos de floración de las especies parentales, dada esta situación se rompe la barrera de aislamiento sexual (Quiroga & al. 2005). Estas características pudieran propiciar el cruzamiento de *P. discolor* con *P. orbicularis*, además de un cruzamiento del híbrido con sus parentales.

En las plantas de *Phyllanthus discolor* y *P. x pallidus*, el color y las dimensiones de los tépalos fueron semejantes. Sin embargo, en *P. orbicularis* la coloración fue diferente. Esta similitud entre *P. discolor* y *P. x pallidus* podría explicar la existencia de un mismo polinizador, puesto que el tamaño de las flores y la coloración influyen en la selección de los polinizadores (Faegri & van der Pijl 1979). Además, las dimensiones de los tépalos no solo influyen en el tamaño de la flor, sino también en la forma de esta. La forma de la flor y su simetría pueden tener gran implicación en la atracción de polinizadores (Gómez & al. 2008). La existencia de un mismo polinizador explicaría los sucesivos cruzamientos entre las poblaciones de *P. discolor* y *P. x pallidus*, y, por tanto, la similitud encontrada en la morfología de las flores de estos dos taxones.

El mayor grado de variabilidad encontrado en el híbrido fue en el número de estambres (9-18), este resultado coincide con el estudio de Webster (1956-1958). Se esperaba con el análisis de este carácter que el híbrido mostrara un número de estambres intermedio con respecto a sus parentales, pero en *Phyllanthus discolor* se encontraron entre 8-13 estambres y en *P. orbicularis* generalmente 6, mientras

que lo registrado por este autor para *P. comptus* es de 5-6 estambres. Webster (1956-1958) concluyó que el aumento en el número de estambres pudiera deberse a un desequilibrio entre los complementos cromosómicos de los padres, lo que pudiese confirmar el origen híbrido de *P. x pallidus*. Por otro lado, este aumento en el número de estambres pudiese explicarse además por la peculiaridad de los híbridos, en donde los mismos presentan dimensiones mayores que las de sus especies progenitoras (vigor híbrido) (Anderson 1948) y pudiese corroborar la hibridación de *P. x pallidus*.

Las semejanzas observadas en los caracteres de las flores femeninas de *Phyllanthus x pallidus* y *P. discolor* (Figura 8) confirma la descripción de Webster (1956-1958) y concuerda con el ACP realizado en el cual no existen, de manera general, diferencias significativas entre *P. discolor* y *P. x pallidus* para los caracteres cuantitativos evaluados (Figura 10). Esta similitud encontrada sugiere, al igual que en las flores masculinas, una posible introgresión de caracteres de *P. discolor* en el híbrido. Los sucesivos cruzamientos pudieran estar favorecidos por el solapamiento de las poblaciones de *P. discolor* y *P. x pallidus* en Cajálbana y por la existencia de un mismo polinizador como se explicó anteriormente.

En relación con los colores y las dimensiones de las flores femeninas, en *Phyllanthus x pallidus* fueron similares a *P. discolor* y difirieron de las flores de *P. comptus* y *P. orbicularis*. Además, *P. orbicularis* presentó dimensiones mayores en los tépalos. Esta semejanza presente en *P. x pallidus* y *P. discolor* pueden estar relacionados con el reclamo de los polinizadores y podría apoyar la existencia de un mismo polinizador, lo que implicaría un mayor cruzamiento del híbrido con *P. discolor*. Las diferencias en contraste de colores y dimensiones de los tépalos en el híbrido con respecto a *P. orbicularis* podrían estar

relacionados con la atracción diferencial de polinizadores. Según Faegri & van der Pijl (1979) el tamaño de las flores y el color influyen en la selección de los polinizadores, lo que pudiera explicar un menor cruzamiento del híbrido con *P. orbicularis* y por tanto una menor similitud.

La similitud en la posición del disco nectarífero entre las flores de *Phyllanthus x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* concuerda con la descripción de Webster (1956-1958) para estos taxones y con lo descrito por Falcón & al. (2018) para *P. orbicularis*. La presencia de un disco nectarífero en la base de los ovarios de las flores femeninas de estos taxones podría sugerir que estas flores son polinizadas por insectos. Este tipo de polinización coincide con lo referido por Alameda & al. (2020) para la especie *P. orbicularis*, quien observó que este arbusto es polinado por varias especies de insectos y que es generalista en Cajalbana. Esta evidencia sumada a la proximidad de las poblaciones de estos tres taxones en Cajalbana, podría favorecer el cruzamiento entre los mismos.

En varios individuos de *Phyllanthus x pallidus* se encontraron anomalías morfológicas (Figura 9). Este resultado coincide con el estudio de Webster (1956-1958), en el cual hace referencia a individuos que presentan rudimentos de flores femeninas. Las anomalías encontradas en la presente investigación podrían estar explicadas por una perturbación en la planta híbrida que presumiblemente se debe a un desequilibrio entre los complementos cromosómicos de los parentales (Webster 1956-1958). El cruzamiento entre diferentes especies altera el apareamiento cromosómico durante la meiosis, lo cual ocasiona reestructuraciones cromosómicas, que tienen como efecto, anomalías morfológicas y, por tanto, inviabilidad del híbrido, lo que puede actuar, generalmente, como un mecanismo de aislamiento reproductivo (Dobzhansky 1937, Rieseberg 1997).

El análisis de la viabilidad de polen fue alto tanto en el híbrido, como en *Phyllanthus discolor* y *P. orbicularis* (Tabla VI). Esto pudiera corroborar que *P. x pallidus* se considera un taxón de origen híbrido establecido desde hace mucho tiempo, donde se deben haber instituido los mecanismos genéticos que garantizan la estabilidad en los procesos de reproducción sexual. Este resultado no concuerda con lo analizado por Webster (1956-1958), quien encontró que los especímenes hibridantes fueron estériles y en los individuos morfológicamente transitorios a *P. discolor* existió una esterilidad moderada.

La formación de nuevas especies a través de grupos híbridos se ha documentado extensamente en plantas (Knobloch 1971, Ellstrand & al. 1996, Rieseberg 1997). Por lo que pudiera considerarse, que desde el punto de vista evolutivo, *Phyllanthus x pallidus* pudiera estar en vías de constituir una especie con características intermedias entre sus progenitores ancestrales. Este comportamiento ha sido referido por González (2007) en algunos híbridos; según este autor el híbrido sería capaz de reproducirse por sí solo, o en otro caso pudiera comportarse como un híbrido que requiere

de la presencia de ambas especies progenitoras y que por lo tanto sólo se observa cuando coexisten poblaciones de ambas especies. Sin embargo, la ausencia de *P. x pallidus* en otras localidades de Cuba donde coexisten las especies *P. discolor* y *P. orbicularis* coincide con el modelo de superioridad presente en algunos híbridos (Moore 1977) donde los híbridos son seleccionados a favor de la selección natural (Anderson 1948, Heiser 1973, Moore 1977, Grant 1981). En este tipo de zonas de hibridación no dependen directamente de la dispersión de los progenitores para persistir sino, la superioridad de los híbridos se encuentra confinada a determinados hábitats particulares, por lo que no pueden establecerse fuera del área de hibridación.

El resultado obtenido en este estudio pudiera corroborarse con la aplicación de técnicas citogenéticas novedosas como la llamada hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o la hibridación genómica *in situ* (GISH) (Herrera 2007) que permitan identificar en el híbrido la presencia de segmentos de genomas de ambas especies progenitoras. La comparación de caracteres morfológicos en los diferentes taxones analizados, mostró que *Phyllanthus x pallidus* es similar vegetativamente a *P. orbicularis* y reproductivamente a *P. discolor* lo que pudiera confirmar que *P. x pallidus* es un híbrido y que sus parentales más probables son *P. orbicularis* y *P. discolor*.

## CONCLUSIONES

La comparación de las características morfológicas estudiadas y la viabilidad de polen pudiera confirmar que *Phyllanthus x pallidus* es un híbrido y que sus parentales más probables son *P. discolor* y *P. orbicularis*. Los caracteres que permitieron la delimitación de los taxones arbustivos en la Sierra de Cajalbana fueron: la forma de la lámina de la hoja, la longitud de las ramas floríferas y el número de hojas por rama. En los taxones *P. x pallidus*, *P. discolor* y *P. orbicularis* los caracteres reproductivos de mayor importancia en este estudio fueron: las dimensiones y color de los tépalos, la longitud del pedicelo y el número de estambres.

## AGRADECIMIENTOS

Al Jardín Botánico Nacional de la Universidad de La Habana por su contribución al desarrollo de esta investigación. A Beatriz Medina Morales y Luis Manuel Leyva por las revisiones críticas del manuscrito. A los revisores anónimos y editores de la Revista del Jardín Botánico Nacional por sus sugerencias y comentarios durante el proceso editorial, en especial a José Angel García-Beltrán.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

A. Castañeda-Correa analizó los datos y escribió la primera versión del manuscrito. B. Falcón-Hidalgo diseñó la investigación y participó en la revisión del manuscrito. Todos los autores contribuyeron en el muestreo y la discusión de los resultados.

## CUMPLIMIENTO DE NORMAS ÉTICAS

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

**Aprobación de ética:** Todos los autores han llevado a cabo el trabajo de campo y la generación de datos de forma ética, incluida la obtención de permisos adecuados.

**Consentimiento para la publicación:** Todos los autores han dado su consentimiento para publicar este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alameda, D., Falcón, B., Rijo, G., de Vales, D., Castañeda, A. & Leyva, L.M. 2020. Diurnal pollination network of "Cuabales de Cajalbana", a serpentine shrubwood in western Cuba. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana*. 41: 25-30.
- Anderson, E. 1948. Hybridization of the habitat. *Evolution* (2): 1-9.
- Berazain, R., Fuente, V., Sanchez-Mata, D., Rufo, L., Rodríguez, N. & Amils, R. 2007. Nickel localization on tissues of hyperaccumulator species of *Phyllanthus* L. (*Euphorbiaceae*) from ultramafic areas of Cuba. *Biol. Trace Elem. Res.* 115: 67-86.
- Dobzhansky, T. 1937. Genetics and the origin of species. Colombia University Press. New York, USA.
- Ellstrand, N.C., Whitkus, R. & Rieseberg, H. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Sciences Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5090-5093.
- Faegri, K. & van der Pijl, L. 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press. Oxford, England.
- Falcón, B., de Vales, D. & Fuentes, S. 2018. Variabilidad morfológica en seis poblaciones de *Phyllanthus orbicularis* (*Phyllanthaceae*), especie endémica de Cuba. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana*. 39: 13-27.
- Falcón, B. 2019. Estudios filogenéticos y morfológicos del género *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*) en Cuba y el resto del Caribe insular. Tesis de Doctorado. Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana.
- Falcón, B., Fuentes, S., Berazain, R. & Borsch, T. 2020. Phylogenetic relationships and character evolution in Neotropical *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*), with a focus on the Cuban and Caribbean taxa. *Int. J. Plant. Sci.* 181(3): 284-305.
- Farooqi, A.H., Shukla, Y.N., Sharma, S. & Bansal, R.P. 1994. Relationship between gibberellin and cytokinin activity and flowering in *Rosa damascena* Mill. *Plant Growth Regul.* 14: 109-13.
- Fiallo, J.L. 2018. Comparación morfológica de los taxones endémicos cubanos del complejo *Phyllanthus chamaecristoides/scopulorum* (*Malpighiales: Phyllanthaceae*). Tesis de Diploma. Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana.
- Figueroa, N. 2016. Las especies de *Phyllanthus* de la subsección *Incrustati*, sección *Williamia*, subgénero *Xylophylla*. Tesis de Diploma. Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana.
- Gómez, J.M., Bosch, J., Perfectti, F., Fernández, J.D., Abdelaziz, M. & Camacho, J. 2008. Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proc. R. Soc. B.* 275: 2241-2249.
- González, A. 2007. Ecología evolutiva de las zonas de hibridación. Pp. 427-435. En: Eguarte, L.E., Souza, V. & Aguirre, X. La ecología molecular de plantas y animales. Ed. Progreso. Tlalpan, México.
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press. Nueva York, USA.
- Grant, V. 1989. Especiación vegetal. Limusa. D. F. México.
- Grisebach, A.H.R. 1865. Diagnosen neuer Euphorbiaceen aus Cuba. *Nachr. Königl. Ges. Wiss. Georg-Augusts-Univ.* 1: 161-181.
- Hammer, Ø., Harper A.T. & Ryan P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1): 4.
- Heiser, C.B. 1973. Introgression re-examined. *Bot. Rev.* 39:347-366.
- Hernández, M. & Falcón, B. 2014. Variabilidad inter e intra específica en la morfología foliar de las especies cubanas de *Morella* (*Myricaceae*). *Biológicas*. 16(1): 43-52. 40.
- Herrera, J.C. 2007. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agron. Colomb.* 25(1): 26-35.
- Hickey, L.J. 1974. Clasificación de la arquitectura de las hojas en dicotiledóneas. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 16(1-2): 1-25.
- IPNI. 2019. The International Plants Names Index. <http://www.ipni.org>. 15 de diciembre de 2019.
- Iwata, H. & Ukai, Y. 2002. SHAPE: A Computer Program Package for Quantitative Evaluation of Biological Shapes Based on Elliptic Fourier Descriptors. *J. Hered.* 93(5): 384-385.
- Knobloch, I.W. 1971. Intergeneric hybridisation in flowering plants. *Taxon* 21: 97-103.
- Marks, G.E. 1954. An aceto-carmine glycerol jelly for use in pollen fertility counts. *Stain Technol.* 29: 277.
- Moore, W.S. 1977. An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Q. Rev. Biol.* 52:263-277.
- Müller, J. 1866. *Euphorbiaceae*. Pp.189-1286. En: Candolle, A. Ed. Prodrum systematis naturalis regni vegetabilis. Strasbourg, London.
- Müller, C. 1952. Ecological control of hybridization in *Quercus*: a factor in the mechanism of evolution. *Evolution* 6: 147-161.
- Ordoñez, B. 2014. Determinación de la Viabilidad y Fertilidad del Polen. CIP. Lima, Perú.
- Quiroga, M.P., Vidal, R. & Premoli, A. 2005. Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N. pumilio* en el noroeste patagónico. *Bosque*. 26(2): 25-32.
- Regalado, L., Ventosa, I., & Morejón, R. 2008. Revisión histórica de los herbarios cubanos con énfasis en las series de especímenes. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana*. 29: 101-138.
- Rieseberg, L.H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 359-389.
- Rieseberg, L.H. & Carney, S. 1998. Plant hybridization. *New Phytol.* 140(4): 599-624.
- Rohlf, F.J. & Slice, D.E. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 39(1): 40-59.
- Solbrig, O.T. & Solbrig, D.J. 1979. Introduction to population biology and evolution. Addison Wesley Pub. Londres, UK.
- StatSoft, Inc. 2011. STATISTICA (data analysis software system), version 7. Disponible en: <http://www.statsoft.com>.
- Thiers, B. 2020+ [actualización continua]. *Index Herbariorum*: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih>. 20 de julio de 2020.
- Webster, G.L. 1956-1958. A monographic study of the West Indian species of *Phyllanthus*. *J. Arnold Arbor.* 37: 91-122, 217-268, 340-359; 39: 39: 49-100, 71-80, 111-212.