

# La reproducción sexual en *Microcycas*. II, El aparato reproductor masculino y la polinización como factor de riesgo.

Esperanza Peña García, Pedro Iván López García y Dalia Pérez Montesinos

Jardín Botánico Nacional de Cuba, Universidad de La Habana

## RESUMEN

El conocimiento de la reproducción sexual en especies raras y amenazadas resulta importante para lograr su conservación *In situ*. Se reportan algunos caracteres morfológicos y fisiológicos de los estróbilos masculinos, microsporangios y microsporas; el estado de la polinización natural en distintas localidades; las posibilidades de preservar microsporas; y los resultados de la polinización artificial con vistas a la recuperación *In situ* de *Microcycas calocoma*.

Se discute la incidencia del aparato reproductor masculino y la polinización como factor de riesgo de extinción y la polinización artificial como alternativa para la obtención masiva de semillas

## ABSTRACT

Knowledge of sexual reproduction in rare and threatened species is important to guarantee their *In situ* conservation. Some morphological and physiological features of microsporangiate cone, microsporangia and microspores are reported; actual status of natural pollination in different localities; possibilities for microspore preservation; and artificial pollination results in order to restore *Microcycas in situ* are analyzed.

Incidence of male reproductive apparatus and pollination as a risk of extinction factor and alternative artificial pollination for massive obtention of seeds are discussed.

## INTRODUCCION

La reproducción sexual de *Microcycas calocoma* ha sido objeto de estudio desde principios del presente siglo debido a la importancia de algunos rasgos del proceso para determinar su ubicación filogenética entre las cícadas vivientes. La producción de numerosos microgametos ciliados en cada "tubo polínico" (Caldwell, 1907; Caldwell, 1909; Downie, 1928); el elevado número de arquegonios que se desarrollan en la superficie del macrogametofito (Reynolds, 1924); y la presencia de una sifonostela en el eje de la plántula (Dorety, 1909), unidos al endemismo estricto del género, a la ausencia de especies afines y a la ausencia de variabilidad morfológica apreciable, a pesar de las reducidas áreas en que habita (Del Risco et al., 1984), han constituido los principales argumentos en contra para su clara ubicación entre las cícadas evolucionadas. No obstante, especialistas dedicados a su estudio refieren la necesidad de que se ejecuten investigaciones profundas en los procesos de polinización y del desarrollo de semillas y ejemplares juveniles para poder llegar a conclusiones definitivas al respecto ( Foster y Rodríguez San Pedro, 1942).

Por otra parte, la preocupación por su rareza y peligro de extinción ( Chamberlain, 1919; Chrysler, 1926; Foster y Rodríguez San Pedro, 1942; Del Risco et al., 1984; Peña et al., 1986, 1988) ha sido asociada a dificultades

en la reproducción sexual, además del impacto que sobre la especie han ejercido las actividades silvícolas y agropecuarias y la extracción de ejemplares para su comercialización como ornamental.

Investigaciones recientes encaminadas a la conservación de la especie (Peña et al., 1986, 1988, 1992, en prensa) reafirman los riesgos de extinción a que está expuesta la misma y reportan la incidencia de la potencialidad de reproducción sexual en la naturaleza como factor de riesgo, que se convierte en el de mayor interés a partir de las medidas de protección estrictas que se tomaron después de que el valioso endemismo fuera declarado Monumento Natural de Cuba en julio de 1989.

La información actualizada del monitoreo realizado durante más de quince años (Peña et al., en prensa) en veinte localidades donde vive *Microcycas calocoma* revela actualmente que el porcentaje de especímenes fértiles en esta especie dioica alcanza poco más del 20% del total de ejemplares (117 ejemplares); que el 9,1% corresponde a plantas masculinas; y que la producción natural de semillas sólo ocurre en el 26,9% de las plantas femeninas existentes. En un estudio anterior (Peña et al., 1986) se reportan datos acerca de los caracteres de la semilla y su capacidad para germinar.

Se evidencia que esta fase del proceso reproductivo no es causa del estado de deterioro actual de la especie en las localidades estudiadas. Sin embargo, se ha referido (Peña et al., en prensa) que la producción anual de semillas es muy escasa y no se corresponde con la probabilidad de polinización natural por el viento entre especímenes muy próximos de ambos sexos. Esto pudiera constituir un riesgo para la regeneración de las poblaciones, unido a las dificultades de implantación de los juveniles en los suelos cársicos.

El aval de conocimientos acumulados hasta la fecha evidencia la importancia de determinar con precisión qué estructuras o procesos previos al desarrollo de las semillas y su germinación están causando la baja eficiencia reproductiva de la especie. De ahí, que el presente estudio haya tenido como objetivos los de complementar los trabajos realizados en el aparato reproductor masculino de *Microcycas calocoma* (Downie, 1928; Foster y Rodríguez San Pedro, 1942; Peña et al., 1988; Norstog, 1990), profundizar en los procesos de polinización y formación de las semillas y evaluar éstos como factores de riesgo para la supervivencia de la especie.

**MATERIALES Y METODOS**

**Producción de estróbilos**

Se realizó un monitoreo anual durante diez años a ejemplares masculinos de *Microcycas calocoma* inventariados en las localidades:

- Loc. 5 (329,253-6) San Juan de Sagua...2 ejemplares
  - Loc. 16 (302,221-1,7,8) Km 14,5 Pinar del Río-Viñales.....1 ejemplar
  - Loc. 17 (306/07,209-1,2,3/6,7) Sierra del Infierno.....9 ejemplares
  - Loc. 18 (308/09,211-3/3,4,5) Sierra del Infierno.....6 ejemplares
- y a dos especímenes cultivados **ex situ** en el Jardín Botánico Nacional.

Se controlaron el inicio y frecuencia de la estrobilación, el número de estróbilos por planta y la época de polinización.

**Morfología y variabilidad**

1. Se cosecharon 20 estróbilos masculinos procedentes de las cuatro localidades citadas, que incluyen especímenes distantes y cercanos (menos de dos metros) a las plantas femeninas productoras y no productoras de semillas, así como de los especímenes cultivados **ex situ**.

A los 20 estróbilos se les evaluó:

- \* forma del estróbilos
- \* longitud total

- \* longitud del pedúnculo
- \* longitud de la región esporógena
- \* diámetro máximo y distancia de la base
- \* número de espirales de esporofilos
- \* número de esporofilos por espiral

2. A cinco de los estróbilos maduros cosechados (uno de cada localidad y uno cultivado **ex situ**) se les separó una espiral de esporofilos (Fig. 1). Se midieron el largo y ancho a 300 esporofilos y en cada uno de éstos se midió el tamaño de 20 esporangios (Fig. 2).

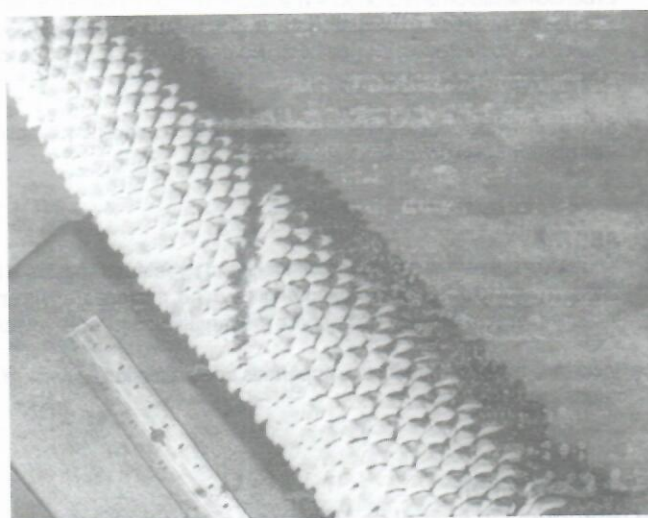


Fig. 1: Estróbilos masculino cosechado en la localidad 17 (306/07, 209-1,2,3/6,7) Sierra del Infierno. Nótese la espiral descrita por los esporofilos desprendidos para el análisis de morfología, variabilidad y viabilidad.

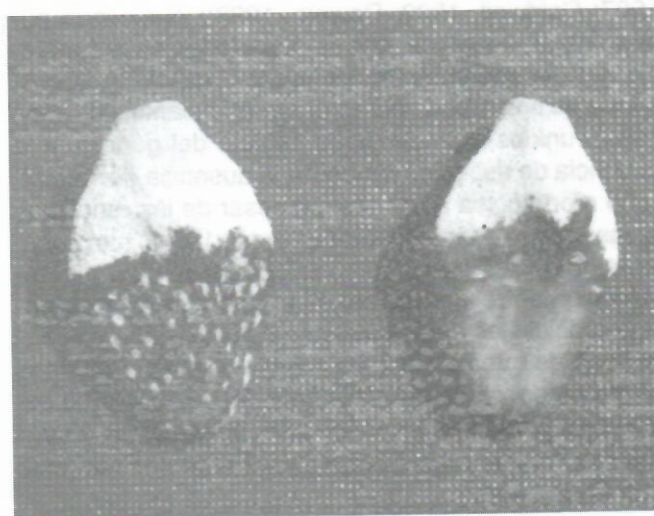


Fig. 2: Microsporofilo y microsporangio aislado de *Microcycas calocoma*. Nótese los esporangios formando soros de a dos y la superficie ocupada por ellos.

Para evaluar la forma y dimensiones de las microsporas, se calculó el valor de dos diámetros perpendiculares en una muestra de 100 microsporas de cada uno de los esporangios medidos.

#### Viabilidad de las microsporas

Se utilizó una técnica para diferenciar citoquímicamente los granos de polen vivos de los muertos (Alexander, 1969) por coloración de los primeros en microsporas de estróbilos recién cosechados. Se evaluó mensualmente una muestra de 200 microsporas procedentes de cada uno de los cinco estróbilos durante un año. También se aplicó la germinación *in vitro* de las microsporas en el medio de cultivo descrito para la germinación de microsporas de *Nicotiana* (Nitsch y Nitsch, 1969) y condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura. Se aplicó un fotoperíodo 12:12 luz/oscuridad y una temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  y se realizaron subcultivos mensuales.

#### Polinización artificial

Se realizó la polinización artificial a los especímenes femeninos de las cuatro localidades referidas que no produjeron semillas por polinización natural durante el tiempo en que se desarrollaron los trabajos de monitoreo realizados (Peña et al., en prensa). Esta polinización se hizo por nebulización exterior parcial de microsporas al megatróbilo, siguiendo la dirección de incidencia según la ubicación del ejemplar masculino más cercano. Además, se aplicó una técnica que teóricamente posibilita una polinización total del estróbilo femenino (Fig. 3).



Fig. 3: Polinización artificial a ejemplar femenino en la localidad 16 (302, 221-1,7,8) Km 14,5 Pinar del Río-Viñales.

Para ello se procedió de la manera siguiente:

1. Se colectaron microsporas frescas de cada localidad separadamente durante la época de polinización
2. Se practicaron dos orificios en cada megatróbilo a polinizar desprendiendo un macrosporofilo: uno a cinco centímetros por encima de la región basal y otro a cinco centímetros por debajo del ápice.
3. Se introdujeron las microsporas en un equipo nebulizador y el tubo de salida de éste, en el orificio de la región basal.
4. Se insufló aire hasta observar la salida masiva de microsporas por el orificio superior.
5. Se protegieron los orificios practicados aplicando propóleo.
6. Se controló la efectividad de la polinización cinco meses después mediante la observación del desarrollo de macrogametofitos.
7. Se comprobó la producción de semillas viables a través de la germinación en condiciones semicontroladas de laboratorio y por el cultivo *in vitro* de embriones como ha sido descrito antes (Peña et al., 1986).

## RESULTADOS

#### Producción de estróbilos

Los especímenes de *Microcycas* estudiados durante diez años produjeron un cono masculino anualmente (Fig. 4A y 4B) a excepción de aquellos ejemplares dañados que presentan más de una rama, en los cuales podía encontrarse un estróbilo en cada una. Curiosamente se observó la producción de dos conos en una rama el mismo año, originados a un mes de diferencia en dos ejemplares vigorosos de la Loc.18 (308/09,211-3/3,4,5) Sierra del Infierno.

Los estróbilos masculinos aparecen desde inicios de mayo, aunque ocasionalmente pueden originarse tardíamente hasta junio-julio. El fenómeno del inicio tardío es independiente del vigor de la planta pues se manifiesta por igual en todos los individuos de cualquier talla, tanto los que crecen *in situ* como *ex situ*, en localidades conservadas o alteradas, y formando parte de poblaciones de cualquier tamaño.

El desarrollo de los estróbilos continúa hasta septiembre-octubre (época de polinización) y puede extenderse hasta noviembre-diciembre si el inicio del desarrollo es tardío. Es importante que este retraso no se asocie a los problemas de desfase que se han reportado (Foster y Rodríguez San Pedro, 1942) como posible causa de una polinización limitada, ya que el fenómeno se produce para un mismo año en las plantas de



Fig. 4: Conos masculinos de *Microcycas* producidos anualmente. A, ejemplar, de una localidad, con estróbilo totalmente desarrollado antes de liberar las microsporas; B, ejemplar cultivado con estróbilo después de la época de polinización.

ambos sexos. La extensión de las condiciones invernales parece ser la causa del retraso en la estrobilación.

#### Morfología y variabilidad

Al madurar, los estróbilos de origen subapical, tienen

forma cilíndrica a cilindro-cónica y un diámetro máximo variable entre 8 y 12 cm a los 5 a 15 cm de la base. Su longitud total es muy variable, oscilando entre 20 y 54 cm de largo, el pedúnculo alcanza los 8 cm en los estróbilos de mayor tamaño y puede presentar 2 cm en los conos menos desarrollados, lo que hace que la región esporógena oscile entre los 18 y 46 cm de largo.

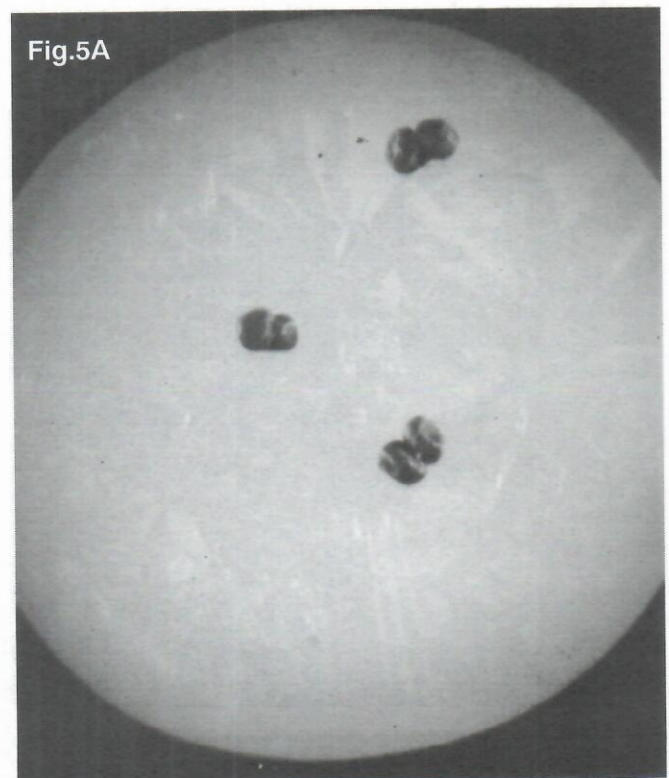
El número de series o espirales también es un carácter variable; se observan entre 11 y 13 series, y en cada una pueden contarse hasta 65 esporofilos.

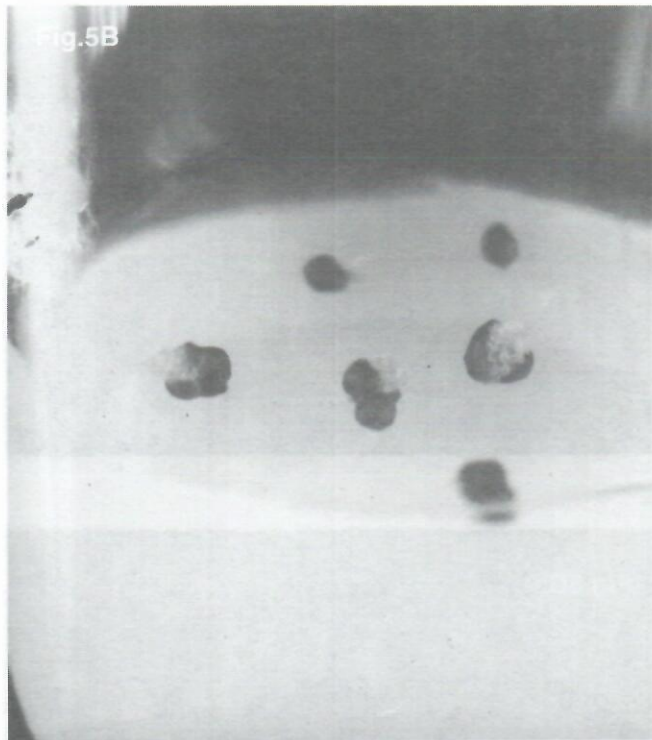
Los microsporofilos son de dimensiones variables, presentan entre 1,5 y 1,8 cm de ancho y entre 1,5 y 2,5 cm de largo. La superficie abaxial presenta numerosos esporangios de forma esférica y diámetro de 1,5 mm; se presentan solitarios o en soros de a dos; y ocupan las dos terceras partes del área.

Las microsporas contenidas en los esporangios son circulares y su tamaño es estable e igual a 50-60 micrómetros.

#### Viabilidad de las microsporas

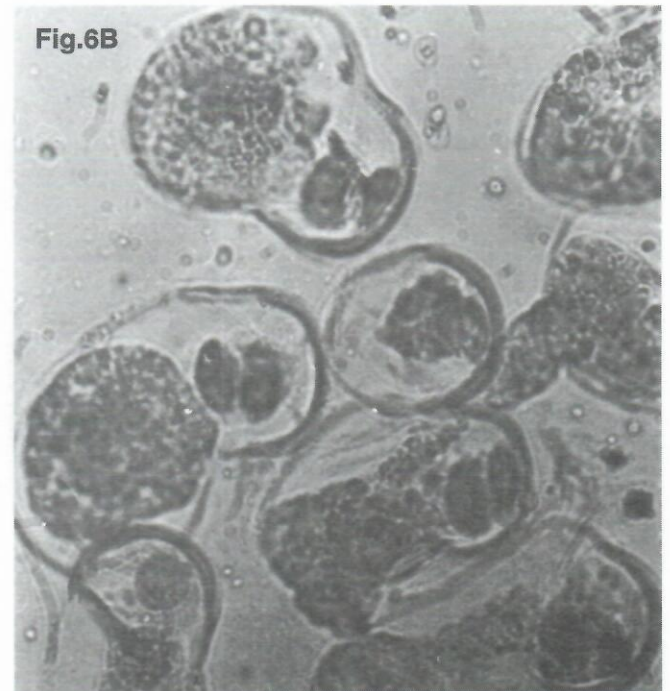
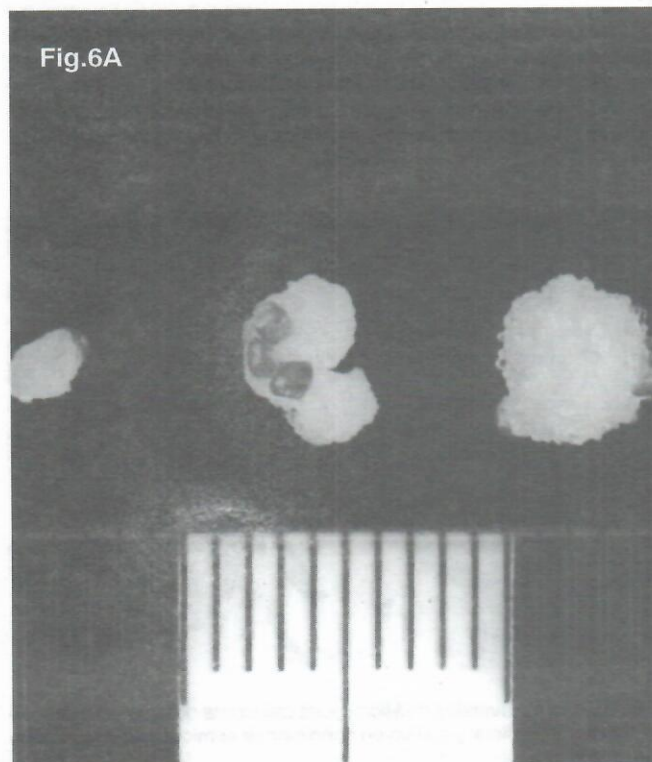
El porcentaje de microsporas fértiles es bajo (32%) y se mantiene estable al menos durante un año; se obtiene una germinación masiva *in vitro* de éstas en el medio y condiciones aplicadas (Fig. 5A y 5B).





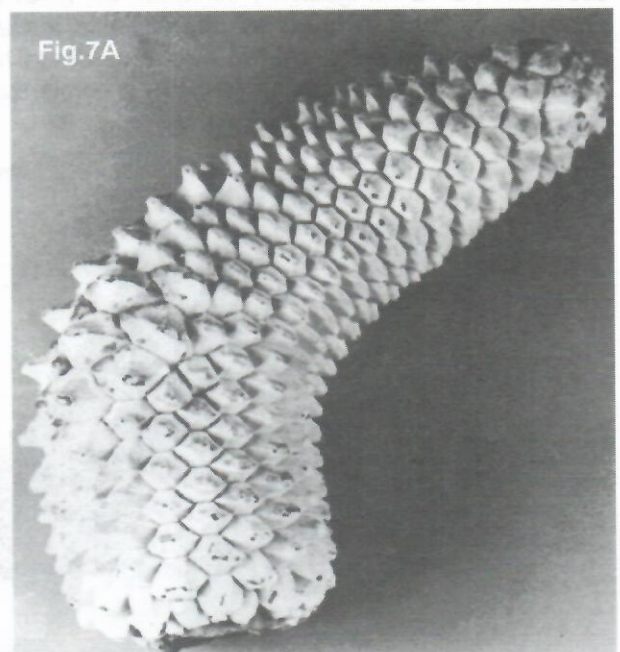
**Fig. 5:** Cultivo *in vitro* de microsporangios en medio reportado para germinación de microsporas (Nitsch y Nitsch, 1969) con fotoperíodo 12:12, luz/oscuridad y temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . A, microsporangios hinchados una semana después de inocular; B, microsporangio recién abiertos con microsporas germinando.

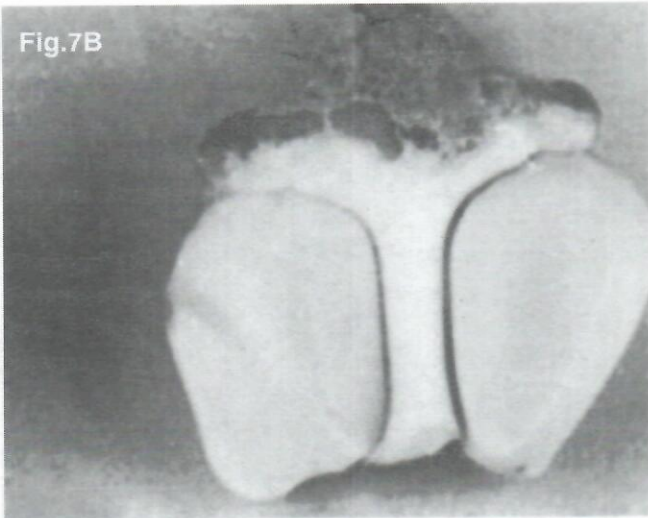
La observación microscópica del material cultivado *in vitro* durante un mes reveló el desarrollo de las fases iniciales del microgametofito (Fig. 6A y 6B).



**Fig. 6:** Desarrollo de microgametofitos *in vitro*. A, desarrollo homogéneo del producto de la germinación de las microsporas viables en uno, tres y cuatro esporangios abiertos; B, desarrollo inicial *in vitro* de los microgametofitos.

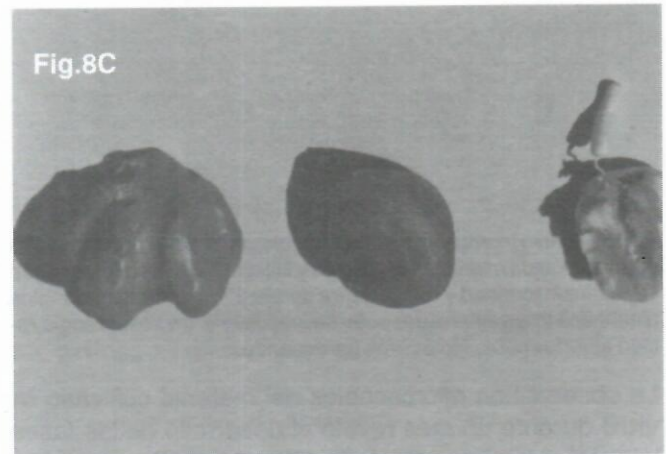
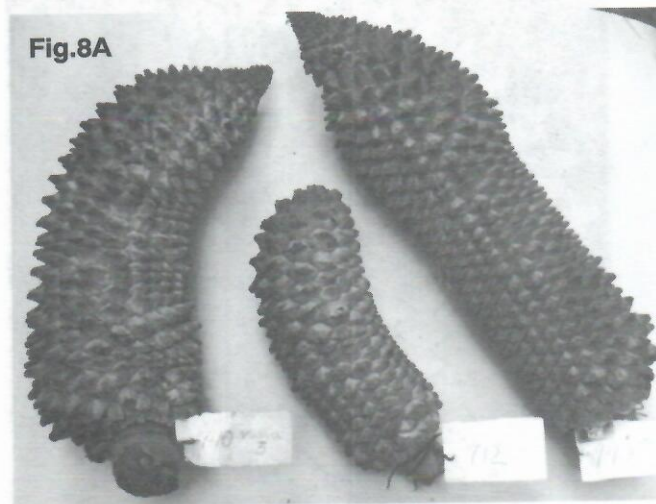
El control de los resultados de polinizar artificialmente los megatróbilos en cuatro localidades de *Microcycas* resultó en un 100% de efectividad a los cinco meses de ejecutada la acción. Independientemente de la manera de polinizar los estróbilos estos se caracterizaron por un incremento en el tamaño y forma de los esporofilos (Fig. 7A y 7B), que dejaban al descubierto porciones de la superficie de los primordios seminales polinizados, de color rosa pálido.





**Fig. 7:** Polinización artificial y unidireccional por la superficie de un megastróbil de *Microcycas*. A, incremento de tamaño del megastróbil por crecimiento de los esporofilos donde ocurrió la polinización y curvatura como consecuencia de ésta; B, aspecto de megasporofilos con primordios polinizados o no. Nótese la diferencia en forma y tamaño que resulta del crecimiento de los primordios seminales.

En los estróbilos polinizados interiormente, el análisis después de su cosecha a los diez meses de la polinización, que coincide con la etapa de dispersión natural de las semillas por desprendimiento de las mismas junto a los macrosporofilos, se evidenció la masividad de la polinización y fertilización de los primordios seminales (Fig. 8A, 8B y 8C). Las semillas germinadas y mantenidas en condiciones semicontroladas (Fig. 9) así como las vitroplantas logradas por cultivo *in vitro* de los embriones (Fig. 10A y 10B) fueron exitosas y tuvieron similar comportamiento a lo reportado antes (Peña et al., 1986); los embriones extirpados inician su desarrollo por la elongación y curvatura del hipocotilo poco después de lo cual se diferencia e inicia el crecimiento la primera hoja. Al mes y medio la hoja puede alcanzar los 3 cm de longitud y comienza el desarrollo de la raíz principal.



**Fig. 8:** Polinización artificial interna por desprendimiento de esporofilos y bombeo de microsporas. A, aspecto externo de los estróbilos cosechados diez meses después de su polinización; B, efectividad de la polinización y fertilización posterior por la producción masiva de semillas; C, aspecto de la semilla madura (izq.), desprovista del tegumento externo (centro) y la región del endospermo primario con el embrión desarrollado (der.).



**Fig. 9:** Plantas juveniles de *Microcycas calocoma* obtenidas a partir de polinización artificial y cultivo en condiciones semicontroladas al cabo de un año.

Fig.10A

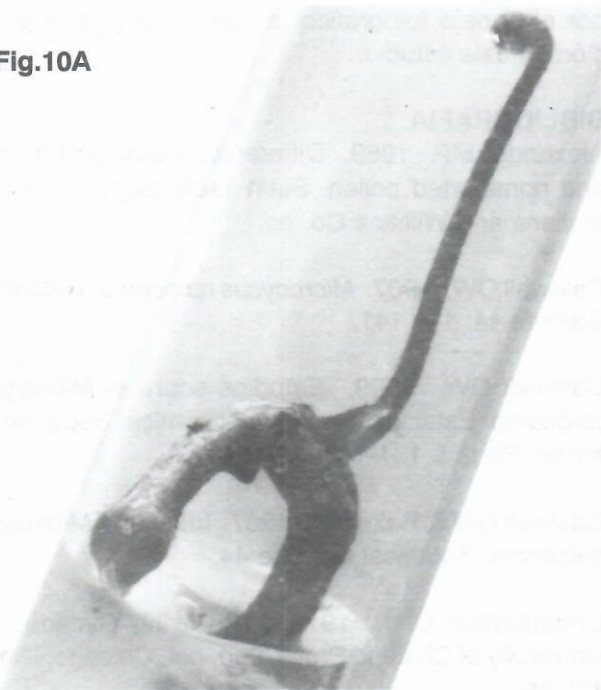


Fig.10B



Fig. 10: Plantas juveniles por cultivo de embriones *in vitro*. A, vitroplanta de un mes y medio desarrollada en medio de Nitsch y Nitsch (1969) bajo fotoperíodo 12:12, luz/oscuridad y temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; B, vitroplantas de un año de edad. Nótese el crecimiento acelerado respecto a lo que ocurre en la naturaleza.

La polinización artificial asegura la obtención de semillas pero, indiscutiblemente, el método de polinización interna evidencia que la obtención de semillas, a través de este método, es de forma masiva y homogénea en todo el estróbilo.

## DISCUSION

La preocupación manifestada por distintos especialistas acerca de la incidencia de dificultades en la reproducción sexual de *Microcycas* (Forster y Rodríguez San Pedro, 1942; Del Risco et al., 1984; Peña et al., 1986; 1988) como posible causa de su rareza y peligro actual de extinción no son infundadas. Esto pudo comprobarse en los estudios de monitoreo realizados recientemente (Peña et al., en prensa).

En el trabajo realizado con el objetivo de determinar la incidencia del aparato reproductor masculino y la polinización como factor de riesgo para la especie se han obtenido resultados que pueden explicar que actualmente la estructura de las poblaciones, en la mayoría de las cuales se presentan sólo ejemplares adultos, y la baja producción de semillas, están relacionadas, en parte, al proceso de polinización.

De una parte, se producen conos masculinos de manera general todos los años, los estróbilos maduran y producen microsporas fértiles en cantidad suficiente para el desarrollo masivo de semillas y con una viabilidad lo suficientemente prolongada como para que una vez que alcancen al estróbilo femenino puedan fecundar, aún cuando exista un desfase en la maduración entre ambos conos.

De otra parte, la ejecución de actividades artificiales para polinizar estróbilos femeninos, independientemente de la técnica aplicada, resulta en la formación de semillas fértiles capaces de germinar. Mediante la polinización exterior de los megastrobilos se obtiene un resultado similar al que ocurriría en plantas femeninas cercanas a las masculinas por polinización anemógama. La acción de procurar que las microsporas alcancen el micropilo de todos los primordios seminales mediante el bombeo de microsporas por el canal interior del estróbilo con la técnica desarrollada, revela que estos maduran normalmente, son receptivos en la época de polinización y son fertilizados masivamente si son alcanzados por las microsporas. Por tanto, puede descartarse la existencia de limitaciones relacionadas al aparato reproductor femenino a excepción de la influencia que pueda tener la separación de los macrosporofilos en la época de polinización.

Los estudios realizados hasta el presente proporcionan una alternativa para la conservación de la especie mediante la ejecución sistemática de acciones artificiales que permitan la obtención de semillas en la mayoría de las localidades donde hoy habita la especie. Esto a su vez, es de utilidad para aplicar técnicas de restitución.

ción con vistas a la recuperación de la especie **in situ** y a su cultivo **ex situ**.

Sin embargo, de los resultados de monitoreo reportados recientemente (Peña et al., en prensa) se observa que la polinización determina la producción de semillas fértiles en 93% de los casos; que los especímenes femeninos que se polinizan y producen semillas (26%) se concentran en sólo seis de las 20 localidades estudiadas (15%) y que la estructura poblacional adecuada sólo se observa en la mitad de estas. Estas cifras indican que existen factores de riesgo adicionales y que probablemente tienen relación con la implantación de juveniles por la caída de semillas en condiciones desfavorables para su germinación y desarrollo ulterior de plántulas (humedad excesiva, agua, suelo esquelético, poca luz, etc).

Pero de otra parte, el 65% de las localidades presentan especímenes de ambos sexos y sólo el 23% de las localidades con el potencial para producir semillas se expresa. Si bien la ubicación relativa de las plantas de ambos sexos puede no favorecer la polinización anemógama en todos los casos, cuando las plantas están próximas, tampoco existe una polinización efectiva siempre.

Desde hace varios años, se retoma el tema de la polinización anemógama en las cícadas con vistas a explicar su relación con el grado de amenaza actual del grupo en la naturaleza (Norstog y Fawcett, 1989; Tang, 1987; Vovides, 1991; Norstog, 1980). Se ha podido demostrar que la polinización por insectos se asocia a varias especies de cícadas.

Las pocas localidades de *Microcycas* donde existe la regeneración natural presentan poca perturbación, lo cual pudiera asociarse con la existencia de un insecto polinizador que ha desaparecido en las áreas perturbadas, explicando la no producción de semillas en áreas con ese potencial. Para ello, es necesario establecer una correlación insecto - regeneración natural - grado de perturbación del habitat, resultado que aportaría considerablemente a la estrategia para la conservación de *Microcycas*.

Independientemente del mecanismo de polinización, los estudios realizados demuestran que las dificultades en el proceso de polinización constituyen un factor de riesgo para la supervivencia de la especie.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Pedro Alvarez Cibreiro

por el trabajo fotográfico realizado durante la ejecución de este estudio.

#### BIBLIOGRAFIA

- Alexander MP. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology* 44(3). The Willians and Willians Co. ed.
- Caldwell OW. 1907. *Microcycas calocoma*. *Botanical Gazette* 44: 118-141.
- Caldwell OW. 1909. Estudios sobre el *Microcycas calocoma*. Estación Central Agronómica. Segundo Informe, Parte I: 131-142.
- Caldwell OW & Baker CF. 1907. Identity of *Microcycas calocoma*. *Botanical Gazette* 44.
- Chamberlain ChJ. 1919. The living Cycads. The University of Chicago Press, 2nd. de., Chicago, Illinois, 172 pp.
- Chrysler MA. 1926. Vascular Tissues of *Microcycas calocoma*. *Botanical Gazette* 87: 233-252.
- Del Risco E, Morel J y Samek V. 1984. Algunos apuntes sobre *Microcycas calocoma* (Miq.) A.DC. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana*. 5: 111-131.
- Dorety HA. 1909. Vascular anatomy of the seedling of *Microcycas calocoma*. *Botanical Gazette* 47: 139-147.
- Downie DF. 1928. Male gametophyte of *Microcycas* 85: 437-450.
- Forster PIP. P.J.Machin, L.Mound and G.W.Wilson, 1994. Insects associated with reproductive structures of cycads in Queensland and northeast New South Wales, *Australia Biotropica* 26: 217-222.
- Foster AS & Rodríguez San Pedro M. 1942. Field studies on *Microcycas calocoma*. *Memorias de la Sociedad Cubana de Historia Natural Felipe Poey XVI(2)*: 105-121.
- Nitsch WP & Nitsch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Norstog KJ. 1980. Wind or insects ? The pollination of cycads. *Fairchild Tropical Garden Bulletin* 35: 28-30.
- Norstog KJ & Fawcett PKS, 1989. Insect-cycad symbiosis and its relation to the pollination of *Zamia*

*furfuracea* (Zamiaceae) by *Rhopalotria mollis* (Curculionidae). American Journal of Botany 76: 1380-1394.

Norstog KJ. 1990. Spermatozoids of *Microcycas calocoma*: ultrastructure. Botanical Gazette 151: 275-284.

Norstog KJ, Fawcett PKS, Kicholls TJ, Vovides AP & Espinosa E. 1995. Insect-pollination of cycads: evolutionary and ecological consideration. Proc. of the therd Int. Conference on Cycad Biology 5-9 July 1993, P.Vorster ed. Cycad Soc. of South África, Stellenbosh.

Peña E, Díaz L y Grillo E. 1986. *Microcycas calocoma*: caracteres de la semilla y su germinación. Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana. 7: 55-70.

Peña E, Chaves R y Pimentel O. 1988. *Microcycas calocoma*: hallazgos interesantes con vistas a sus posibilidades de conservación. Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana. 9: 87-99.

Peña E, Grillo E y Pérez D. 1992. Influencia de distintos factores en las posibilidades de propagación *in vitro* de *Microcycas calocoma* (Miq.) A.DC. Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana. XIII: 83-93.

Peña E, López PI y Lazcano J. 1996-97. La reproducción sexual de *Microcycas*. I, Estudios de monitoreo *in situ*. Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana. (en prensa)

Reynolds LG. 1924. Female gametophyte of *Microcycas*. Bot. Gazette 77: 391-403.

Tang, W., 1987. Insect pollination in the cycad *Zamia pumila* (Zamiaceae). American Journal of Botany 74: 50-99.

Vovides AP. 1991. Insect symbionts of some mexican cycads in their natural habitat. Biotropica 23: 102-104.

**Recibido:** 15 enero de 1997.