

## *Encephalartos manikensis* Gilliland: Obtención de juveniles por cultivo *in vitro* de embriones.

Esperanza Peña García y Dalia Pérez Montesino

Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

### INTRODUCCIÓN

En el presente, se realizan esfuerzos considerables para lograr la conservación de especies silvestres amenazadas a través de la ejecución de estrategias integradas con los enfoques *ex situ* e *in situ*. Parte importante dentro de estos esfuerzos se relaciona a lograr la reproducción natural de las especies y/o el establecimiento de técnicas de propagación que incrementen el número de especímenes con celeridad.

El grupo de las cícadas está considerado bajo amenaza de extinción según los criterios vigentes para el otorgamiento de categorías (IUCN, 1994). La presión sobre distintas especies de alto valor ornamental por coleccionistas así como las limitaciones reproductivas de estas especies dioicas le confieren interés especial a los trabajos tendientes a establecer mecanismos eficientes para su propagación y cultivo *ex situ*.

*Encephalartos manikensis* Gilliland es oriundo del distrito de Manika en el occidente de Mozambique y crece silvestre en la región nororiental de Zimbabwe y el centro de Mozambique en las montañas, a altitudes cercanas a los 1400 m snm, ya bien entre vegetación herbácea o en los bosques decíduos (Dyer, 1965a,b; Dyer y Verdoom, 1969a,b).

La especie ha sido cultivada a partir de sus semillas y de los hijos basales que produce, en condiciones de semisombra o luz natural directa, sin que se hayan reportado dificultades para la germinación de las semillas, a excepción de las limitaciones comunes a todas las cícadas respecto a su corta viabilidad (Jones, 1993).

En el presente trabajo se reportan los resultados obtenidos por la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* al crecimiento de embriones maduros procedentes de semillas almacenadas, con lo cual será posible la representación *ex situ* de esta valiosa especie, incluida en el Apéndice I de la C.I.T.E.S., en las colecciones del Jardín Botánico Nacional así como en cualquier lugar donde existan las condiciones para su crecimiento posterior.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Material vegetal

Se utilizó un lote de 22 semillas procedentes de Zimbabwe

(Permiso CITES P97039 CH9282648 del día 30.12.97), extraídas el 4 de julio de 1997 del banco de semillas (No. 31161).

Las semillas se mantuvieron durante siete meses en los envases originales hasta su utilización y a temperatura ambiente de almacenaje ( $25 \pm 2$ ) °C los dos últimos meses.

Las semillas se lavaron superficialmente con agua corriente abundante y se realizó una primera desinfección utilizando lejía comercial Kinsol al 40 % durante 20 minutos. Seguidamente se eliminó el tegumento interno (esclerotesta) y se procedió a extirpar los embriones maduros con una porción del endospermo a utilizar para su desarrollo *in vitro*. La presencia de embriones se comprobó por el abultamiento del extremo micropilar.

#### Desarrollo de embriones *in vitro*

Los embriones se inocularon en frascos de cristal blanco conteniendo el medio MS sin ioduro de potasio (Peña y Grillo, 1982) introduciendo la mitad inferior en el medio nutritivo y orientados con la región micropilar hacia arriba. Los frascos se mantuvieron en la cámara de crecimiento a ( $25 \pm 2$ ) °C y luz continua, blanca, artificial, difusa de baja intensidad. Se realizaron trasplantes cada 28 días mientras se mantuvo el crecimiento *in vitro* de las plantas.

#### Aclimatización y desarrollo *ex situ*

Las vitroplantas desarrolladas *in vitro* se lavaron con agua corriente abundante hasta eliminar todo el agar; se trasplantaron a jardineras con buen drenaje y sustrato compuesto de tierra vegetal (humus) y arena silíceas en iguales proporciones, manteniendo la humedad elevada. Las vitroplantas continuaron su desarrollo en un umbráculo con buena aireación y con luz natural filtrada al 50 %.

Se realizaron evaluaciones cualitativas y cuantitativas de las semillas y del crecimiento *in vitro* de los embriones y su desarrollo a plantas juveniles.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procedimiento aplicado para extirpar los embriones a inocular *in vitro* evidenció que, de la misma manera que

ocurre en otras cícadas (Peña *et al.*, 1986), no todos los primordios seminales que se desarrollan después de ocurrida la polinización producen embriones cigóticos como consecuencia de la fertilización de los mismos, y por tanto, no todos forman verdaderas semillas. De las 22 "semillas" del lote, sólo el 63,67 % (14) contienen un embrión. En el 36,33 % restante, los primordios seminales al arribar a la época de maduración del megarótilo, presentan externamente las mismas características en cuanto a dimensiones y coloración. No obstante, internamente éstos presentan el gametofito necrosado, y la lámina de tegumento fina y papirácea, de color marrón que lo rodea, se torna en esta etapa gruesa, coriácea y de color negro.

El material iniciado *in vitro* se comportó de manera muy homogénea en su desarrollo inicial; se observa el proceso típico de hinchamiento marcado de los embriones a las 24 horas de inoculados los explantos en el medio nutritivo, llegando a quebrar el tejido endospermico que le rodea. Al cabo de una semana, el hipocótilo ha crecido verticalmente hacia arriba 5 mm y se ha tomado de color verde intenso (Fig. 1). Pasados los 15 días en cultivo comienza a producirse una curvatura que alcanza los 180°, después de lo cual, se inicia el desarrollo de la raíz (Fig. 2). La velocidad con que transcurre esta fase es muy variable y puede prolongarse hasta los dos meses.

Todos los explantos con embriones desarrollaron vitroplantas y el proceso difiere del que ocurre en condiciones naturales ya que el crecimiento *in vitro* ofrece al embrión las condiciones para que las primeras hojas se desarrollen poco después de iniciado el crecimiento de la raíz principal. Transcurridos cinco meses, las vitroplantas pueden ser aclimatizadas con un 100 % de supervivencia, aún cuando no se les proporcione una cámara húmeda. Por las características de estas plantas, un sustrato que permita un buen drenaje como el que proporciona la arena silíceo con tierra vegetal y un riego diario contribuyen al crecimiento acelerado de los juveniles, los cuales, a los ocho meses tienen entre dos y tres hojas verdes (Fig.3).

Sería de interés conocer el tiempo de almacenaje máximo que garantice la viabilidad de las semillas y si para esta especie, la aplicación de las técnicas *in vitro* constituye la única posibilidad de obtener juveniles después de un proceso de almacenamiento largo. Como ha sido reportado con anterioridad (Peña *et al.*, 1986, Peña, 1997) en *Microcycas calocoma*, una vez transcurrida la época de cosecha, las semillas son incapaces de germinar a pesar de que los embriones se mantienen vivos. En el *Encephalartos manikensis* la viabilidad se mantiene un

tiempo mayor, no obstante, no se ha comprobado si la pérdida de viabilidad de las semillas de esta especie coincide o no con la muerte del embrión.



Fig. 1. Fases iniciales del desarrollo *in vitro* de embriones de *Encephalartos manikensis*. A (Arriba), El embrión cultivado en medio sólido, colocado en posición vertical, incrementa su volumen y la región de los cotiledones, limitada externamente por el tejido del endospermo se agrieta; el hipocótilo toma color verde intenso a medida que crece en dirección vertical hasta los 5mm de longitud, después de lo cual comienza a curvarse; B (Abajo), Fase tardía en que comienza a desarrollarse la raíz.



Fig.2. Embrión de *Encephalartos manikensis* con el hipocótilo completamente desarrollado y la raíz principal penetrando en el medio de cultivo. Durante esta etapa, comienza el desarrollo de hojas.



Fig.3. Plantas juveniles de *Encephalartos manikensis* obtenidas por cultivo *in vitro* de embriones y aclimatizadas después de ocho meses en umbráculo. Las plantas crecen en jardineras, bajo luz natural filtrada al 50 % y riego diario.

Hoy día, las colecciones de cícadas *ex situ*, enriquecidas a través del intercambio de germoplasma, constituyen una vía de conservación de estas valiosas especies. Sin embargo, la experiencia acumulada respecto a

la efectividad de lograr plantas a partir de las semillas, recibidas después de un proceso de almacenamiento en bancos de semillas no ha sido favorable. Se argumenta que las semillas pierden con rapidez su viabilidad, que el embrión muere. Para *Microcycas calocoma*, se demostró que las semillas almacenadas e incapaces de germinar en condiciones semicontroladas de vivero, mantienen el embrión vivo y sus embriones son capaces de crecer *in vitro* y desarrollarse adecuadamente mucho tiempo después que pierden la capacidad para germinar (Peña *et al.*, 1986). Esta posibilidad parece ser aplicable también al *Encephalartos manikensis*, aunque se requiere de un conocimiento mayor sobre el tiempo que mantienen sus semillas el poder de germinación. El intercambio de cícadas a partir de sus embriones *in vitro* o de las semillas con la técnica a aplicar, favorecerá sin dudas el intercambio internacional y conservación *ex situ* de estas valiosas especies.

#### BIBLIOGRAFÍA

Dyer RA. 1965a. New Species and Notes on Type Specimens of South African *Encephalartos*, Journal of South African Botany 31, 111-121.

Dyer RA. 1965b. The Cycads of Southern Africa, Bothalia 8, 404-515.

Dyer RA and Verdoom IC. 1969a. The Flora of Southern Africa, Bothalia 8, 404-515.

Dyer RA and Verdoom IC. 1969b. *Encephalartos manikensis* and its Near Allies, Kirkia 7, 147-158.

IUCN. 1994 IUCN Red List Categories, 40th Meeting of the IUCN Council Gland, Switzerland, 1-15.

Jones DL. 1993. Cycads of the World, ed. REED, Australia, *Encephalartos*, p.177-224.

Peña E. 1997. El cultivo «*in vitro*» aplicado a la conservación de *Microcycas calocoma*, *Actas Etnobotánica* 92: 195-200.

Peña E y Grillo E. 1982. Proliferación de *Microcycas calocoma* (Miq.) A.DC. "in vitro", *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana*, 3:2, 117-196.

Peña E, Díaz L y Grillo E. 1986 *Microcycas calocoma*: Caracteres de la semilla y su germinación. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana*, 7:3, 55- 70.

**Recibido:** 26 de octubre de 1998.

**Direcc. de los autores:** Jardín Botánico Nacional, Carretera "El Rocío" km 3½, Calabazar, Boyeros. CP. 19230, Ciudad de La Habana, Cuba.