

# Estudios para la conservación de *Zamias* cubanas:

## 3. Técnicas de propagación aplicadas a *Zamia integrifolia* L. y *Zamia pygmaea* Sims.

Leonel del Risco González, Esperanza Peña García y Dalia Pérez Montesinos

Jardín Botánico Nacional, Universidad de la Habana

### RESUMEN

La caracterización morfológica de las semillas y sus embriones y la obtención de juveniles por técnicas convencionales y/o biotecnologías, constituye un aspecto imprescindible para la conservación de las especies cubanas de *Zamia*, valiosas desde el punto de vista científico y ornamental. Se ofrecen datos de morfología de las semillas y embriones de *Zamia pygmaea* y *Zamia integrifolia*; se caracterizan la germinación en condiciones semicontroladas y el desarrollo de juveniles obtenidos por crecimiento *in vitro* de embriones maduros. Se evalúan las diferencias en el vigor de los juveniles y el desarrollo alcanzado por éstos a través de la aplicación de distintas técnicas. El resultado proporciona alternativas para la obtención de las plantas requeridas con vistas a la conservación *in situ* y *ex situ* de las especies estudiadas. Se discuten los resultados.

**Palabras clave:** cultivo *in vitro*, germoplasma, propagación, *Zamia*

### ABSTRACT

Morphological features of seeds and embryos and means for obtaining juveniles by applying conventional techniques and/or biotechnologies constitute an important aspect for conservation of Cuban species of *Zamia*, for their scientific and ornamental values. Data of seed and embryo morphology of *Zamia pygmaea* and *Zamia integrifolia* are offered; germination process under semi-controlled conditions and juvenile development through *in vitro* growth of mature embryos are characterized. Differences between vigor of juveniles and development reached by them after applying different techniques is evaluated. The obtained results give alternatives for obtaining the required plants to be used in conservation of the studied species *in situ* and *ex situ*. Results are discussed.

**Key words:** *in vitro* culture, germoplasm, propagation, *Zamia*

### INTRODUCCIÓN

Las zamias en Cuba se han colectado a lo largo de todo el país; el inventario y la caracterización de las poblaciones existentes, la determinación de los factores de riesgo, el diseño de un banco de germoplasma y en general, de una estrategia integrada de conservación, actualmente se encuentran en vías de solución (López *et al.*, 2000). Para ello, el desarrollo de técnicas para su propagación y cultivo constituyen un elemento imprescindible. La obtención de la tecnología y la eficiencia de su utilización dará la posibilidad de abrir una discreta brecha a la comercialización de especímenes valiosos desde el punto de vista científico. Además, la donación, el intercambio y la comercialización podrían ser más seguras desde el punto de vista conservacionista.

Desde hace algo más de 40 años, comenzaron a aparecer reportes sobre la aplicación de la biotecnología en los distintos géneros de cícadas tendientes a lograr la multiplicación acelerada (De Luca *et al.*, 1979; Norstog & Rhamstine, 1967; Brown & Teas, 1966; Laliberte *et al.*, 1983; Koeleman & Small, 1982; Peña & Grillo, 1982; Peña *et al.*, 1992; Osborne & van Staden, 1987; Norstog, 1965; Webb *et al.*, 1983). En Cuba, se han realizado trabajos en cuanto a la aplicación de estas técnicas a

*Microcycas calocoma* con fines conservacionistas (Peña & Grillo, 1982; Peña *et al.*, 1986; Peña *et al.*, 1992; Peña, 1997). Sin embargo, las zamias cubanas no presentan antecedentes en este particular y es solo recientemente (González, 2000) que se llega a concluir su status taxonómico en el que se define la existencia de siete especies de las cuales cuatro habitan en Cuba occidental: *Zamia pygmaea*, *Z. ottonis*, *Z. integrifolia* y *Z. amblyphyllidia*.

El presente trabajo tuvo como objetivo ofrecer los elementos para la propagación convencional y biotecnológica de dos especies de *Zamia*, incluyendo la caracterización de las semillas, los requerimientos y características de la germinación en condiciones semicontroladas, así como el procedimiento para lograr el crecimiento *in vitro* de embriones maduros aplicando la experiencia obtenida en *Microcycas* para la que se establecieron esquema de desinfección, medio nutritivo y condiciones de cultivo (Peña & Grillo, 1982; Peña *et al.*, 1992).

### MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del germoplasma

Se utilizó germoplasma de dos especies de *Zamia* que

habitan en Cuba occidental: *Zamia pygmaea* procedente de la **localidad 1** ubicada en la Reserva Ecológica Los Indios en la Isla de la Juventud, (208, 296) y *Zamia integrifolia* de plantas que crecen en la **localidad 10**, Reserva Ecológica Varahicacos en la Península de Hicacos, Matanzas ( 374,485). Las semillas maduras fueron colectadas en el mes de febrero de estróbilos polinizados naturalmente que culminaron su desarrollo. En el caso de *Z. pygmaea* se utilizaron semillas procedentes de tres estróbilos y de *Z. integrifolia* se cosechó germoplasma a partir de cinco estróbilos, con lo cual se garantizó el material para el cultivo **in vitro** y la propagación convencional.

#### **Caracterización morfológica de la semilla**

Las semillas se estudiaron cuantitativa y cualitativamente, para ello fueron pesadas con y sin la sarcotesta, en un balanza analítica de 0.01 g de precisión y medidas su longitud axial, que se corresponde con la orientación del embrión. Los aspectos cualitativos que se tuvieron en cuenta para el análisis de la morfología externa fueron: forma de la semilla, color y textura de la sarcotesta y la esclerotesta.

La cantidad de semillas de cada especie se dividió aleatoriamente en dos, y al material a utilizar con objetivos de propagación **in vitro**, se les extirpó el embrión a fin de realizar su caracterización. Ésta incluyó, forma, orientación, coloración y longitud.

#### **Germinación de semillas en condiciones semicontroladas**

Se utilizaron 40 semillas de *Z. pygmaea* y 122 de *Z. integrifolia* para su implantación en un sustrato compuesto de humus neutro, turba y tierra roja en iguales proporciones, en bandejas de germinación, asegurando buen drenaje, un 50% de la luz natural incidente y una humedad ambiental alta (alrededor del 80%). El riego se efectuó cada 48 horas.

El valor en días para la germinación de las semillas se evaluó semanalmente atendiendo al número de días requeridos para la emergencia del hipocótilo, ya que como en otras cícadas, la radícula emerge tardíamente. Luego las plantas jóvenes se trasplantaron a bolsas de polietileno de pequeño diámetro, pero de una longitud mayor de 25 cm para no limitar el crecimiento en longitud de la raíz y evitar los trasplantes frecuentes. El sustrato en esta etapa fue el mismo utilizado en las bandejas de germinación.

#### **Cultivo in vitro de embriones maduros**

Se utilizaron 40 semillas de *Z. pygmaea* y 122 de *Z. integrifolia* para el cultivo **in vitro** de embriones maduros, en caso de que este existiera. Después de eliminar ambos tegumentos, las almendras se colocaron en una cápsula

de petri con lejía comercial durante 5 minutos. En la cámara de siembra, se extirparon los embriones y se sembraron directamente en tubos de cultivo. La inoculación se realizó en posición vertical, de manera tal que la región de los cotiledones quedara inmersa en el medio de cultivo y no el extremo opuesto, de donde se desarrollaron el hipocótilo, la raíz y las hojas como ha sido referido antes ( Peña *et al.*, 1999).

Se utilizó el medio nutritivo aplicado al crecimiento **in vitro** de embriones maduros de *Microcycas calocoma* (Peña & Grillo, 1982) y una vez inoculados los embriones, se mantuvieron en cuarto de cultivo, bajo luz artificial blanca y difusa de baja intensidad, controlada a 16 horas diarias y temperaturas entre 24 y 28 °C.

Los trasplantes se realizaron cada 28-30 días independientemente del desarrollo alcanzado, hasta tanto las plantas alcanzaron el extremo superior del tubo. Finalmente las vitroplantas se aclimatizaron en igual sustrato y condiciones de cultivos que las aplicadas a las semillas germinadas.

## **RESULTADOS**

#### **Caracteres morfológicos de la semilla**

Los caracteres cuantitativos y cualitativos analizados muestran una constancia dentro de cada especie, las semillas de *Zamia pygmaea* tienen un peso promedio de 0.43 g y las de *Z. integrifolia* presentan un peso de aproximadamente 0.99 g, en ambos casos su forma es irregular y la sarcotesta, con un espesor muy variable, puede llegar a medir hasta 3 mm. El promedio de longitud de la semilla fue de 10.2 mm en *Z. pygmaea* y de 12.3 en *Z. integrifolia*.

En las dos especies la esclerotesta se presenta como una capa dura, lisa, de color pardo opaco. A nivel de esta cubierta se distingue externamente la huella del micrópilo en un extremo, que consiste en un punto hundido limitado por una región pardo oscura prominente. En el extremo opuesto, como un punto más tenue y prominente se localiza la zona de unión de la semilla al esporófilo.

Con pocas variaciones en su morfología cuando maduro y débilmente unido a los cotiledones, existe un solo embrión dispuesto con su eje mayor paralelo al largo mayor de la semilla que mide como promedio en *Z. pygmaea* 6 mm y en *Z. integrifolia* 9 mm. En ambos casos en el tercio orientado hacia la región micropilar, se distingue una región cilindro cónica con una coloración rosada de entre 1 y 2 mm, y en el extremo se observa un delgado suspensor arrollado en espiral.

Los caracteres cualitativos no aportaron elementos que puedan ser utilizados para diferenciar a ambas especies

estudiadas, sin embargo los aspectos cuantitativos que se tuvieron en cuenta muestran diferencias, sobre todo en el peso y longitud de la semilla y el embrión.

**Cultivo de semillas en condiciones semicontroladas**

El cultivo de semillas en condiciones semicontroladas mostró diferencias marcadas en la germinación y el desarrollo, con respecto al tiempo empleado por ambas especies en su desarrollo, de modo que las semillas de *Z. pygmaea* mostraron en todos los casos un retardo marcado con respecto a las de *Z. integrifolia* (Fig. 1a y b).

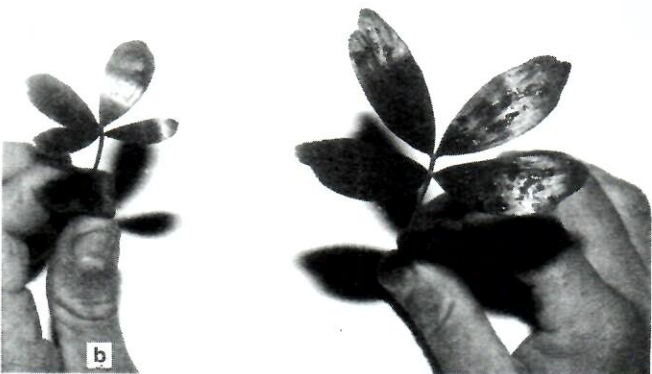
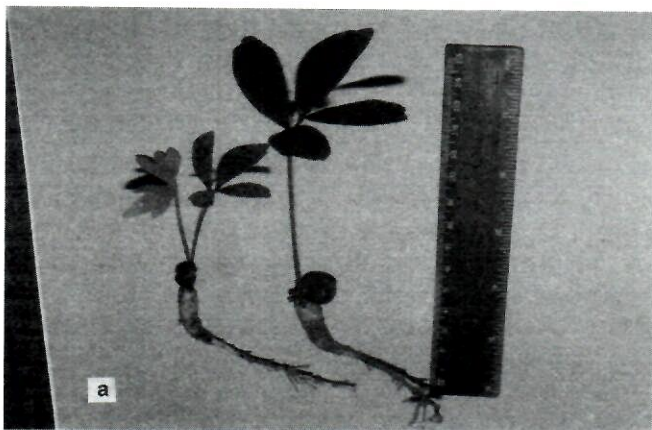


Fig. 1. Plantas de *Zamia* de 5 meses. a. izq. *Z. pygmaea*, der. *Z. integrifolia*. b. Diferencias en los folíolos.

En el caso de *Z. integrifolia* a la tercera semana comienza la salida de una pequeña proyección, por el extremo micropilar, que cuando alcanza entre 3 y 5 mm comienza a curvarse hacia el fondo del sustrato, durante la cuarta semana comienza a desarrollarse la primera hoja a partir de una ranura de 2 a 3 mm que se abre a pocos milímetros del extremo micropilar. Luego de siete semanas las pequeñas plantas presentan una hoja de aproximadamente tres centímetros, al igual que la raíz.

Al quinto mes las plantas jóvenes presentan 1 ó 2 hojas

de 8-11 cm y los rizomas entre 7 y 9 cm.

En las semillas de *Z. pygmaea* se inicia la salida de la proyección por el extremo micropilar hacia la cuarta semana, dos semanas después comienza la salida de la raíz y de la primera hoja, a las siete semanas estas estructuras han alcanzado alrededor de 1,5 cm en ambos casos. Al quinto mes las plantas más vigorosas de esta especie presentan hojas de 5-6 cm y rizomas de 6-9 cm, el resto alcanza este estado alrededor del séptimo mes.

Los rendimientos obtenidos se muestran en la tabla I.

**TABLA I**

Rendimiento de producción de plantas en condiciones semicontroladas.

especie	# semillas	# plantas	% plantas
<i>Z. pygmaea</i>	40	14	35
<i>Z. integrifolia</i>	122	33	27

**Cultivo in vitro de embriones maduros**

Los embriones maduros produjeron respuestas diferentes entre las dos especies estudiadas con relación al cultivo, en cuanto al tiempo invertido en el crecimiento y en alcanzar diferentes estadios de desarrollo; los eventos fueron prácticamente los mismos, solo que con un retardo marcado en el caso de *Z. pygmaea*; en ambos casos el hinchamiento posterior a la inoculación comenzó entre las 48 y 72 horas. En *Z. integrifolia* comienza el desarrollo del hipocótilo entre la segunda y tercera semana, en esta última comienza a elongarse y a doblarse (Fig. 2), donde uno de los extremos se torna blanquecino (hipocótilo) y el otro dará origen futuro a la raíz, ya en la cuarta o quinta semana el embrión ha tomado un color verdoso y comienza a formarse una apertura por la que emerge la primera hoja, paralelamente comienza a crecer la raíz. Alrededor de la séptima semana la hoja presenta por lo general cuatro folíolos y ha alcanzado aproximadamente 2 cm y la raíz cerca de 1cm (Fig. 3); en algunas ocasiones el desarrollo inicial de las plantas no se comporta de este modo y se presentan embriones con una germinación anómala (Fig. 4). A los 6 meses las vitroplantas de 1 ó 2 hojas y con una raíz de 2-2,5 cm están listas para su adaptación a sustrato (Fig. 5).

En el caso de *Z. pygmaea* el hipocótilo comienza su desarrollo entre las 5 y 6 semanas después de haberse inoculado, alrededor de la séptima semana comienza la formación de la apertura por la que aparece entre las 8 y 9 semanas la primera hoja, hecho que ocurre como en *Z. integrifolia* a la par de la formación de la raíz. Alrededor de los 6 meses las hojas presentan aproximadamente 2 cm y la raíz ha alcanzado 1cm y luego de 10 meses la mayoría de estas vitroplantas están listas para su paso a sustrato, pero existen profundas diferencias en el grado de

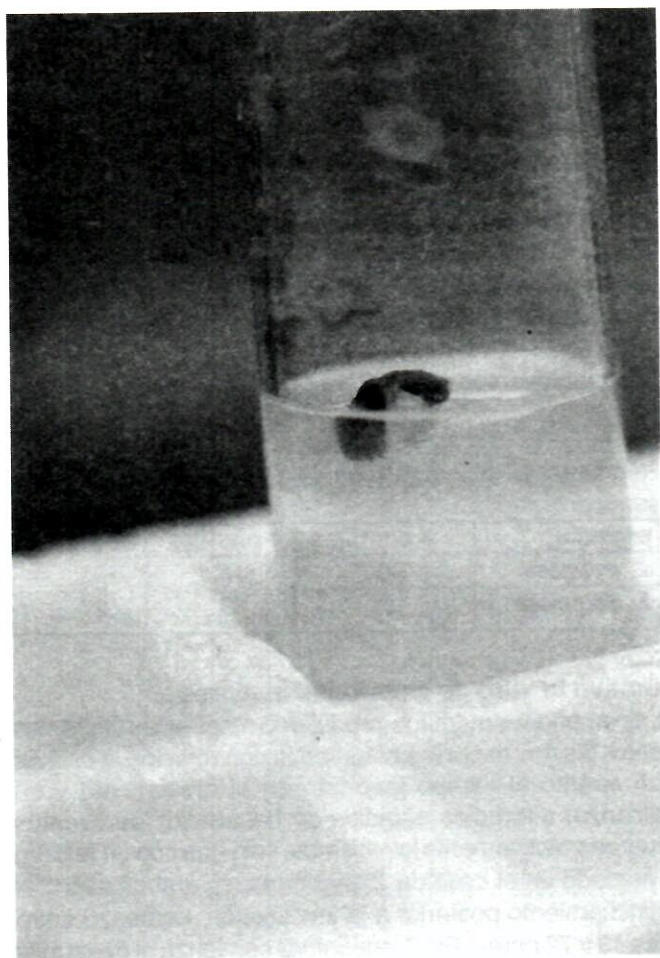


Fig. 2. Embrión de *Z. integrifolia* a las tres semanas de su implantación *in vitro*.

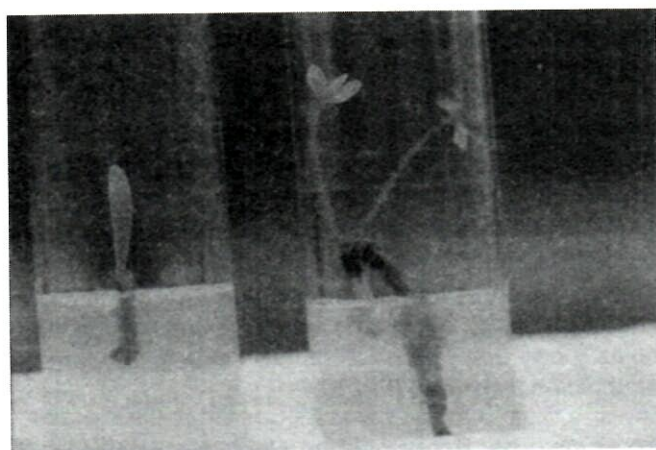


Fig. 4. Crecimiento inicial anómalo de hojas de *Z. integrifolia*.

desarrollo de las mismas, de modo que al finalizar este periodo existen vitroplantas en todos los estadios explicados, incluso algunos embriones se presentan con el mismo desarrollo que tenían al momento de su implantación (Fig. 6).

Los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento de la semilla después de 6 meses se muestran en la tabla II.

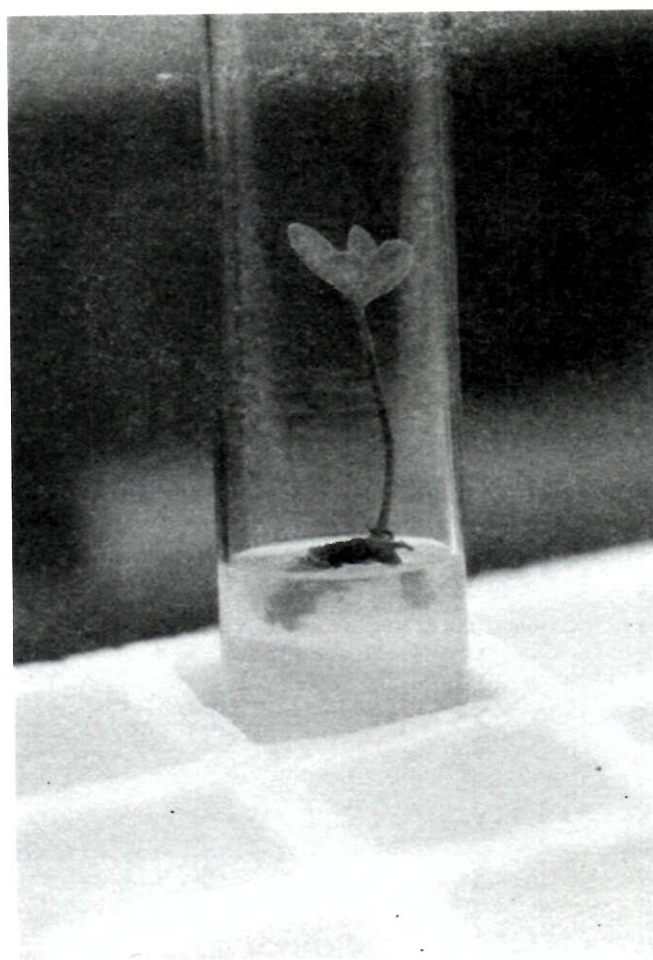


Fig. 3. Vitroplanta de siete semanas de *Z. integrifolia* con una hoja de cuatro foliolos.

#### DISCUSIÓN

Las semillas de *Zamia* presentan una forma irregular y las variaciones en estas se originan durante el desarrollo del macrogametofito, en que, como sucede en *Microcycas* (Peña *et al.*, 1986) el aumento de cada unidad en el estróbilo se traduce en el desarrollo de presiones entre los óvulos contiguos. La consistencia carnosa del tegumento externo permite las deformaciones. Luego de formada la semilla su aspecto irregular se relaciona además con la deshidratación gradual de la sarcotesta. Las diferencias cuantitativas encontradas (peso y longitud de semilla y embrión), pudieran estar relacionadas con diferencias interespecíficas, pero dada la variabilidad observada en estos caracteres, suponemos necesario un análisis estadístico profundo en una muestra mucho mayor.

La germinación en el cultivo convencional mostró más bajos rendimientos que la experiencia del cultivo *in vitro*, lo que puede explicarse si se tiene en cuenta que en este último experimento lo que se implanta en el medio es el embrión, de modo que quedan desechadas las semillas que no lo presentan, mientras que *in vivo* lo cultivado

**TABLA II**

Rendimiento del cultivo de semillas *in vitro*.

especie	# semillas	# embriones	%	# vitroplantas	%
<i>Z. pygmaea</i>	40	38	95	29	76.3
<i>Z. integrifolia</i>	122	62	50.8	31	50

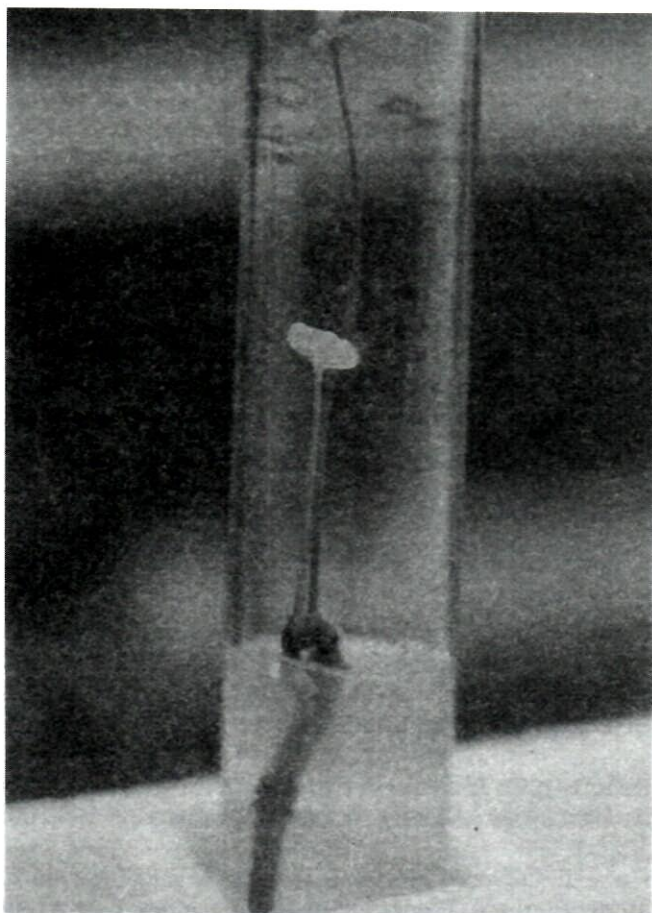


Fig. 5. Vitroplanta de *Z. integrifolia* previa a su adaptación a sustrato.

son las semillas, sin conocimiento previo del porcentaje de éstas que presentan embrión.

Las diferencias obtenidas entre las especies estudiadas tanto en el cultivo convencional como en el cultivo *in vitro* en cuanto al desarrollo, aportan un carácter importante para reconocer estas especies, lo que sin dudas corrobora los resultados taxonómicos propuestos por González (2000), aunque se debe tener en cuenta que el sustrato empleado para el cultivo convencional se corresponde en mayor grado con el suelo de la localidad natural de *Z. integrifolia*, lo que podría ser causa de algunas diferencias en el desarrollo de estas especies, sin que llegue este hecho a tener un peso fundamental, pues en

las experiencias *in vitro*, ninguna de las especies tiene ventaja alguna y las diferencias se mantienen.

Contrario a lo planteado para *Microcycas calocoma* (Peña *et al.*, 1992), en las dos especies estudiadas de *Zamia* la técnica aplicada de cultivo *in vitro*, con los medios y condiciones aplicadas, no constituye la mejor vía para la producción masiva de plantas, pues los rendimientos, aunque favorecen a esta técnica no son sustancialmente superiores si se tiene en cuenta el hecho, ya discutido, de la ausencia de un muestreo previo de presencia de embriones en la semilla en el caso del cultivo convencional. Además, las plantas producidas a partir de semillas en condiciones semicontroladas presentan, en todos los casos, un desarrollo más acelerado que las de cultivo *in vitro*, en el que se llega incluso a la producción de plantas en la mitad de tiempo que el invertido en producir vitroplantas listas a adaptarse (Fig. 7), a la vez que se simplifica su producción pues se evitan la serie sucesiva de pases de un medio a otro, las dificultades en mantener las condiciones requeridas de temperaturas e iluminación y la adaptación al sustrato definitivo, donde usualmente se pierden plantas.

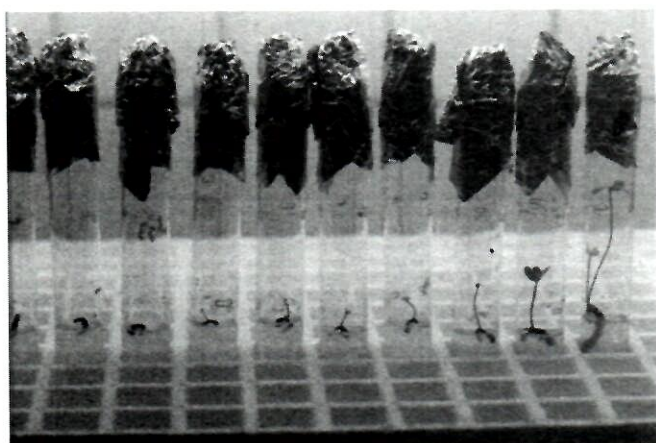
### CONCLUSIONES

Las características morfológicas de las semillas de *Zamia* estudiadas no constituyen un carácter taxonómico para diferenciar *Z. pygmaea* de *Z. integrifolia*, pero presentan un comportamiento diferente con relación al porcentaje de embriones presentes y a la germinación, lo que unido a diferencias en el desarrollo pueden constituir elementos importantes en el reconocimiento de estas especies.

Los bajos rendimientos obtenidos de la aplicación de las técnicas convencionales de propagación pueden atribuirse al porcentaje de semillas con embriones, que es desconocido.

Las condiciones para la germinación y cultivo de las plantas obtenidas con ambas técnicas de propagación resultan adecuadas para su crecimiento en las dos especies estudiadas.

La propagación convencional aplicada a las dos especies estudiadas resulta la técnica más adecuada para la obtención de posturas vigorosas con una o dos hojas y un buen desarrollo radicular en cinco meses.



**Fig. 6.** Diferentes etapas de desarrollo de embriones y vitroplantas de *Z. pygmaea*.

La técnica *in vitro* aplicada favorece el crecimiento de embriones y la producción de vitroplantas de origen cigótico, aunque de menor desarrollo y a mayor costo que las obtenidas por la vía convencional. Por ello, la utilización de la técnica *in vitro*, con las condiciones descritas, constituye un aporte para el desarrollo de investigaciones tendientes a la obtención de callos embriogénicos y ulterior diferenciación de embriones somáticos, pero no para la producción masiva de plantas.

#### BIBLIOGRAFÍA

Brown CL and Teas HJ. 1966. Cycad tissue culture on a defined medium. South Am Soc. Plant Physiol, Proc ASAW, Jackson, Miss.

De Luca P, Moretti A and Sabato S. 1979. Regeneration in megagametophytes of cycads. Gi. Bot. Ital. 113: 129-143.

Gonzalez L. 2000. La Familia Zamiaceae en Cuba. Informe de Resultado. Proyecto CITMA 01302121. Jardín Botánico Nacional. La Habana.

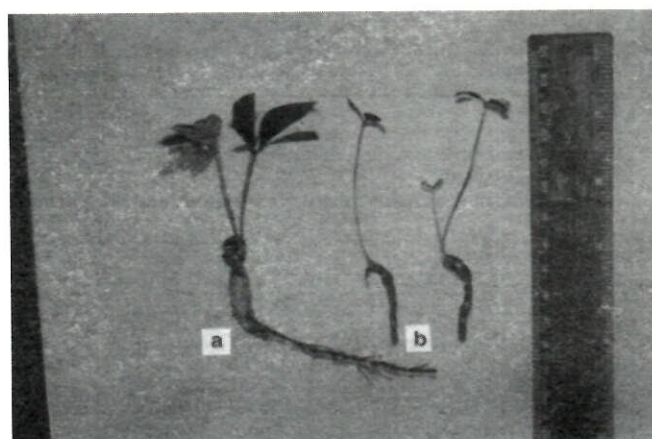
Koelman A and Smal JGCI. 1982. A note on callus formation by stem and root tissue of some *Encephalartos* spp. S. Africa J Bot 1: 165-166.

Laliberte S, Bertrand C and Veith H. 1983. Callogenesis and degree of differentiation in endosperm cultures of *Encephalartos villosus*. Rev. Can. Biol. Exp. 42: 7-12.

Lopez P, Lazcano J, Peña E and Pérez D. 2000. Estrategia integrada para la conservación de *Zamia*. Informe de Resultado. Proyecto CITMA 01302121. Jardín Botánico Nacional. La Habana.

Norstog K and Rasmstine E. 1967. Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissues. Phytomorphology 17:374-381.

Norstog K. 1965. Induction of apogamy in



**Fig. 7.** Plantas de *Z. pygmaea* con igual periodo de cultivo.

a. Planta obtenida por cultivo convencional de semilla.

b. Vitroplantas producidas a partir de cultivo de embriones maduros.

megagametophytes of *Zamia integrifolia*. Am J Bot 52:993-999.

Osborne R and van Staden J. 1987. *In vitro* regeneration of *Stangeria eriopus*. HortSci 22:1326.

Peña E y Grillo E. 1982. Proliferación *in vitro* de *Microcycas calocoma* (Miq.) A.DC. Revista del Jardín Botánico Nacional, III: (2) 177 - 196.

Peña E, Díaz L y Grillo E. 1986. *Microcycas calocoma*: caracteres de la semilla y su germinación. Revista del Jardín Botánico Nacional 7: 55 - 70.

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 del Jardín Botánico Nacional XIII: 83-93.

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

Peña E, López PI, Pérez D, Arteaga M and Torriente Z. 1999. Paquete Tecnológico: Producción y Cultivo de Germoplasma requerido para el fomento de un banco de germoplasma de campo de *Microcycas calocoma* en el llano. Informe Final de Resultado.

Webb DT, Rivera MS, Straszak E and Matos J. 1983. Callus initiation and organized development from *Zamia pumila* explants. Ann Bot 51: 711-717.

**Recibido:** 9 de febrero del 2001.

**Direcc. de los autores:** Jardín Botánico Nacional, Carretera "El Rocío" km 3 ½, Calabazar, Boyeros. CP. 19230, Ciudad de La Habana, Cuba.